

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GABRIELA BARROS SILVÉRIO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE
ALGINATO OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA ASSOCIADA À
INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA COM CONCENTRADO PROTEICO
DE SOJA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA
2018

GABRIELA BARROS SILVÉRIO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA ASSOCIADA À INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA COM CONCENTRADO PROTEICO DE SOJA

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Coorientadora: Profa. Dra Lyssa Setsuko Sakanaka

LONDRINA
2018

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

S587p Silvério, Gabriela Barros

Produção e caracterização de micropartículas de alginato obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática com concentrado proteico de soja / Gabriela Barros Silvério. - Londrina : [s.n.], 2018.

76 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Lyssa Setsuko Sakanaka

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2018.

Bibliografia: f. 64-76.

1. Microencapsulação. 2. Gelificação. 3. Alginatos. 4. Eletrostática. 5. Proteínas de soja. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira, orient. II. Sakanaka, Lyssa Setsuko, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n. 66

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA ASSOCIADA À INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA COM CONCENTRADO PROTEICO DE SOJA

por

GABRIELA BARROS SILVÉRIO

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de **MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos**, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina às 14 horas e 30 minutos de 24 de agosto de 2018. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

**Prof. Dr. Carlos Raimundo. Ferreira
Grosso**
UTFPR – Câmpus Londrina
Orientador

Prof. Dr. Fabio Yamashita
UEL - Londrina
Membro Examinador Titular

Visto da coordenação:

Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai
UTFPR – Câmpus Londrina
Membro Examinador Titular

Profa. Dra. Lúcia Felicidade Dias
(Coordenador do PPGTAL)

A folha de aprovação assinada encontra-se arquivada na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade que me foi dada e por guiar cada passo da minha vida.
À Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Departamento Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Dr Carlos Raimundo Grosso, pelo apoio, orientação, sugestões no desenvolvimento deste trabalho e por todo o ensinamento transmitido.

À professora Dra Lyssa Sakanaka pelo apoio, dedicação e coorientação no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores Marianne Shirai e Fabio que com dedicação corrigiram este trabalho.

A Izabela Alvim pelo auxílio nas análises de distribuição de tamanho e morfologias.
Aos colegas Ermelindo, João e Marcela pela ajuda nas análises e ensinamentos nas mais diversas circunstâncias da vida de laboratório.

Aos meus pais Rose e Geraldo, ao meu irmão Heitor e ao meu noivo Tiago pela força e incentivo, amo muito vocês.

Aos meus familiares e amigos pela torcida.

A todos que estiveram comigo nesta caminhada.

Que os nossos esforços
desafiem as impossibilidades.
Lembra-vos de que as grandes
proezas da história foram conquistadas
daquilo que parecia impossível.
(Charles Chaplin)

RESUMO

SILVÉRIO, Gabriela B. **Produção e caracterização de micropartículas de alginato obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática com concentrado proteico de soja.** F 85. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2018.

A microencapsulação é uma técnica que vem sendo amplamente estudada para a proteção de compostos bioativos e controle de sua liberação. A combinação dos métodos de encapsulação envolvendo a gelificação iônica e interação eletrostática permite a obtenção de matrizes com melhores propriedades tecnológicas em relação as técnicas utilizadas individualmente. Na gelificação iônica a aplicação do alginato como material de parede produz partículas porosas, e o recobrimento por interação eletrostática com uma proteína pode permitir a obtenção de partículas mais protetivas. Neste contexto o objetivo do projeto foi produzir micropartículas de alginato através da técnica de gelificação iônica e recobri-las com concentrado proteico de soja por interação eletrostática. Dois fatores importantes foram estudados, o teor de cálcio utilizado na gelificação iônica (0,8% ,1,6% e 2,4% p/p) e o pH (3,5 e 7,0) para o recobrimento eletrostático com uma camada proteica. O potencial Zeta dos biopolímeros e das partículas foram determinados. As partículas foram caracterizadas quanto a morfologia, tamanho médio e sua distribuição e quanto ao teor de proteína adsorvida nas situações estudadas. As partículas obtidas apresentaram-se esféricas (230 - 330 μm), recheio distribuído de forma multinuclear, com superfície contínua e visualmente lisas, porém com variação grande em seus tamanhos médios, característica intrínseca da utilização de um atomizador duplo fluido para a obtenção das partículas. A variação do teor de cálcio não foi significativa na variação do potencial Zeta e conseqüentemente na adsorção proteica. Por outro lado, o pH utilizado na adsorção proteica foi significativo, com adsorções muito maiores em pH 3,5 (6,5 - 6,7% de proteína adsorvida) comparado ao pH 7,0 (< 2,0% de adsorção proteica), indicando que pH foi determinante no recobrimento proteico. Nesta situação, partículas de gelificação iônica e a proteína apresentam potenciais Zeta com cargas opostas satisfazendo a condição de pH de trabalho acima do pKa do alginato e abaixo do ponto isoelétrico da proteína. A avaliação qualitativa morfológica da adsorção proteica das partículas indicou maior adsorção em pH 3,5 corroborando com o teor de proteína determinado neste pH.

Palavras-chave: Microencapsulação. Gelificação iônica. Interação eletrostática. Proteína de soja. Soja.

ABSTRACT

SILVÉRIO, Gabriela B. **Production and characterization of alginate microparticles obtained by ionic gelation associated with the electrostatic interaction with soy protein concentrate.** F 85. Dissertation (Professional Master in Food Technology) - Federal Technology University - Parana. Londrina, 2018.

Microencapsulation is a technique that has been extensively studied for the protection of bioactive compounds and their release control. The combination of encapsulation methods, like ionic gelation and electrostatic interaction allows the production of matrices with better technological properties, compared to the application of one of the methods alone. In ionic gelation the application of alginate as a wall material produces porous particles, and coating it with a protein, by electrostatic interaction, may contribute to a better protection of the active compound. In this context, the objective of the project was to produce alginate microparticles through the ionic gelation technique and to coat them with soy protein concentrate by electrostatic interaction. Two important factors were studied, calcium concentration during ionic gelation (0.8%, 1.6% and 2.4% w/w) and pH (3.5 and 7.0) of the protein solution for electrostatic interaction. Zeta potential of biopolymers and particles were determined. Particles were characterized according to its morphology, average size and size distribution, as well as protein adsorption. Particles presented spherical shape (230 - 330 μm), multinuclear distribution of active compound, continuous and smooth surface, with a great variety of average size, characteristic of a double fluid atomizer nozzle used to obtain the particles. Calcium concentration did not influence the zeta potential and, consequently, the protein adsorption of particles. On the other hand, pH used in protein adsorption showed significant effect, with higher adsorption occurring at pH 3.5 (6.5 to 6.7% of adsorbed protein) compared to pH 7.0 (< 2.0% of adsorbed protein). This indicates that pH was determinant for the protein coating. At this situation, ionic gelation particles and proteins present zeta potential values with opposite charges, which satisfies the condition of pH of study being higher than the alginate pKa and lower than the isoelectric point of the protein. The qualitative morphological evaluation of the protein adsorption of the particles indicated higher adsorption at pH 3,5 corroborating with the protein content determined at this pH.

Keywords: Microencapsulation. Ionic gelation. Electrostatic interaction. Soy protein. Soy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo do modelo “caixa de ovos”. Os pontos negros representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação com os íons cálcio	18
Figura 2 - Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G- e dos blocos heteropoliméricos MG-, que constituem a molécula de alginato, Em (A) tem-se uma sequência M-M; em (B) uma sequência G-G e em (C) um sequencia M-G-M.	20
Figura 3 - Gráfico da curva de solubilidade da proteína de soja em função do pH ...	23
Figura 4 - Solução 1 CPS pH 7,0 e solução 2 CPS pH 3,5	43
Figura 5 - Solução de proteína solúvel do CPS nos pHs 3,5 e 7,0.....	43
Figura 6 - Microscopia óptica das micropartículas sem revestimento proteico com fonte de luz convencional (A) e fonte de luz de fibra ótica (B), 1) Partículas 0,8% CaCl ₂ ; 2) Partículas 1,6% CaCl ₂ ; 3) Partículas 2,4% CaCl ₂	53
Figura 7 - Microscopia óptica das micropartículas com revestimento proteico no pH 3,5 com fonte de luz convencional (A) e fonte de luz de fibra ótica (B), 1) Partículas 0,8% CaCl ₂ ; 2) Partículas 1,6% CaCl ₂ ; 3) Partículas 2,4% CaCl ₂	55
Figura 8 - Microscopia óptica das micropartículas com revestimento proteico em pH 7,0 com fonte de luz convencional (A) e fonte de luz de fibra ótica (B) 1) Partículas 0,8% CaCl ₂ ; 2) Partículas 1,6% CaCl ₂ ; 3) Partículas 2,4% CaCl ₂	57
Figura 9 - Béqueres com micropartículas coradas com Coomassie Blue, após aplicação do descolorante. A) Partículas com CPS pH 3,5; B) Partículas com CPS pH 7,0; C) Partículas sem adsorção proteica.	59
Figura 10 - Microscopia óptica das micropartículas com revestimento proteico nos pHs 3,5 e 7,0 coradas com Coomassie Blue. Imagens obtidas com fonte de luz convencional (A) e fonte de luz de fibra ótica (B).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição proximal do concentrado proteico de soja (CPS) e alginato (ALG) em base seca	34
Tabela 2 - Potencial Zeta das soluções de biopolímeros	35
Tabela 3 - Potencial Zeta das micropartículas produzidas em diferentes concentrações de cloreto de cálcio	38
Tabela 4 - Composição de proteína nas soluções de CPS pH 3,5 e 7,0.....	44
Tabela 5 - Teor de cálcio em partículas de alginato produzidas por gelificação iônica	44
Tabela 6 - Teores de umidade, proteína e cinzas das micropartículas em diferentes concentrações de cloreto de cálcio (%) e pH.	47
Tabela 7 - Tamanho médio das micropartículas com e sem recobrimento proteico.	49
Tabela 8 - Polidispersidade (SPAN) das micropartículas com e sem revestimento proteico.	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 MICROENCAPSULAÇÃO.....	16
3.2 GELIFICAÇÃO IÔNICA.....	17
3.2.1 Alginato	19
3.3 INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA.....	21
3.3.1 Proteínas da Soja	22
3.3.2 Concentrado Proteico de Soja.....	24
3.4 COMPLEXAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM PROTEÍNAS.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 MATERIAIS.....	27
4.2 MÉTODOS	27
4.2.1 Caracterização físico-química dos biopolímeros.....	28
4.2.2 Determinação do Potencial Zeta dos biopolímeros.....	28
4.2.2.1 Potencial Zeta das soluções e partículas de alginato com e sem recobrimento proteico.....	28
4.2.3 Elaboração da solução de concentrado proteico de soja	29
4.2.4 Produção de partículas de alginato por gelificação iônica.....	29
4.2.5 Determinação do teor de cálcio das partículas de alginato.....	30
4.2.6 Recobrimento das partículas de gelificação iônica com proteínas por interação eletrostática.....	31
4.2.7 Caracterização das micropartículas	31
4.2.7.1 Composição proximal	31
4.2.7.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas com e sem recobrimento proteico.....	32
4.2.7.3 Morfologia das partículas úmidas de alginato com e sem recobrimento de proteínas.....	32
4.2.7.4 Avaliação qualitativa morfológica da adsorção proteica utilizando Coomassie Blue.....	33
4.3 TRATAMENTO DOS DADOS.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS.....	34
5.2 POTENCIAL ZETA.....	35
5.2.1 Determinação do potencial Zeta das soluções dos biopolímeros.....	35
5.2.2 Potencial Zeta das partículas de alginato com e sem recobrimento proteico.....	38
5.3 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA SOLÚVEL DO CPS.....	41
5.4 TEOR DE CÁLCIO EM PARTÍCULAS DE ALGINATO.....	44
5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE ALGINATO RECOBERTAS COM CPS.....	46
5.5.1 Composição proximal das micropartículas	46
5.5.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas com e sem recobrimento proteico.....	49
5.5.3 Morfologia das partículas úmidas de alginato com e sem recobrimento proteico.....	52

5.5.4 Avaliação qualitativa morfológica da adsorção proteica com o Coomassie Blue.....	58
6 CONCLUSÃO	62
7 SUGESTÕES PARA NOVOS TRABALHOS	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO 1 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas sem recobrimento produzida a 2,4% de CaCl ₂	77
ANEXO 2 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 3,5 produzida a 2,4% de CaCl ₂	78
ANEXO 3 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 7,0 produzida a 2,4% de CaCl ₂	79
ANEXO 4 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas sem recobrimento produzida a 1,6% de CaCl ₂	80
ANEXO 5 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 3,5 produzida a 1,6% de CaCl ₂	81
ANEXO 6 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com Revestimento proteico em pH 7,0 produzida a 1,6% de CaCl ₂	82
ANEXO 7 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas sem recobrimento produzida a 0,8% de CaCl ₂	83
ANEXO 8 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 3,5 produzida a 0,8% de CaCl ₂	84
ANEXO 9 - Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 7,0 produzida a 0,8% de CaCl ₂	85

1 INTRODUÇÃO

A microencapsulação pode ser definida como um processo de empacotamento com finas camadas poliméricas aplicáveis a sólidos, líquidos ou material gasoso, em que é possível a liberação do material encapsulado no local e tempo desejado sob estímulo específico. Essa tecnologia vem sendo bastante estudada e aplicada nas áreas farmacêutica, alimentícia, agropecuária, dentre outras (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; JAFARI, et al., 2008).

O encapsulamento em matrizes poliméricas possibilita proteger ou impedir o contato do composto ativo com substâncias do meio externo, além de proteger contra o pH, luz, oxigênio, condições de passagem pelo trato gastrointestinal e aumentando a vida útil do material encapsulado (BARANAUSKIENÉ et al., 2007). Diferentes compostos podem ser empacotados, incluindo antioxidantes, compostos ativos, ácidos graxos essenciais, enzimas e microrganismos probióticos. (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

As micropartículas podem ser obtidas por diferentes técnicas, entre elas encontra-se a gelificação iônica, onde ocorre a interação de uma solução polimérica com uma solução iônica de carga oposta à apresentada pelo polímero, formando uma estrutura em gel. A gelificação iônica é um método simples, barato, rápido, com utilização de polissacarídeos atóxicos, com condições brandas de temperatura e não requer solventes orgânicos (SCHOUBBEN et al., 2010).

O alginato é um polímero natural amplamente utilizado na microencapsulação como material de parede, devido a sua simplicidade, biocompatibilidade, não toxicidade, característica de formar hidrogéis na presença de cátions bivalentes, como o cálcio ou o bário, e custo relativamente baixo (KRASAEKOOPT et al., 2003).

No entanto, a matriz de gel do alginato obtida por esse método caracteriza-se por baixa resistência mecânica e elevada porosidade, podendo resultar em elevados índices de difusão do material encapsulado. Algumas estratégias são propostas para melhorar esta funcionalidade, como o recobrimento das micropartículas com um polieletrólito de carga oposta à apresentada pelo gel, por meio da técnica de interação eletrostática (FARRIS et al., 2009; FUJIWARA et al., 2010).

Alguns autores vêm avaliando a adsorção de proteínas por interação eletroestática em micropartículas, como a gelatina (LI et al., 2009; QV et al., 2011; YAO et al., 2012) e as proteínas do soro do leite (GEBARA et al., 2013; SCHMITT et al., 1999; SOUZA et al., 2012). Porém, ainda são escassos os estudos utilizando as proteínas da soja como biopolímeros catiônicos para formação de complexos com partículas porosas de alginato.

A aplicação de proteínas vegetais, como a proteína da soja, para o recobrimento de partículas produzidas por gelificação iônica pode ser uma alternativa para a adsorção da proteína através de interações eletrostáticas, com o propósito de aumentar a resistência mecânica e reduzir a permeabilidade das microcápsulas, contribuindo para uma maior proteção do material de recheio. Além disso o Brasil ocupa hoje o segundo lugar em produção mundial de soja, tornando-se essa cultura um dos principais produtos agrícolas de importância econômica e de maior crescimento nas últimas décadas (EMBRAPA, 2017).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver micropartículas pela técnica de gelificação iônica utilizando alginato de sódio, com posterior recobrimento com concentrado proteico de soja (CPS) por interação eletroestática, avaliando a adsorção de proteínas da soja sobre as partículas, bem como a caracterização físico-química e morfológica das mesmas.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas de alginato por meio da técnica de gelificação iônica, recobri-las com concentrado proteico de soja por interação eletrostática em diferentes valores de pH e de concentração de cálcio.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os métodos combinados de gelificação iônica e interação eletrostática na produção das micropartículas;
- Analisar a influência da composição proximal e o potencial Zeta dos biopolímeros e das partículas nos métodos utilizados;
- Verificar o efeito da concentração de cloreto de cálcio em solução para a produção das micropartículas de alginato;
- Estudar a influência de diferentes pHs sobre o recobrimento proteico;
- Avaliar a composição proximal das micropartículas com e sem recobrimento proteico, assim como a sua morfologia, tamanho médio e distribuição de tamanho.
- Analisar a morfologia das micropartículas por microscopia com fonte de luz de fibra óptica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MICROENCAPSULAÇÃO

A tecnologia da microencapsulação foi fundamentada a partir do modelo celular, no qual o núcleo é envolto por uma membrana semipermeável (material de parede) que atua protegendo-o do meio extracelular e, simultaneamente, controla a entrada e saída de substâncias na célula sob estímulos específicos (JIZOMOTO et al., 1993). Segundo Champagne e Fustier (2007), a microencapsulação é o processo de empacotamento de materiais sólidos e líquidos formando partículas denominadas microcápsulas que podem liberar seu conteúdo de forma controlada e sob condições específicas ao longo do tempo.

Quando empregada em alimentos, a microencapsulação tem a função de proteger uma substância ou ingrediente das condições adversas do meio (luz, pH, umidade, oxigênio, calor, interações com outros compostos e evaporação do material ativo encapsulado), conservando a viabilidade do material encapsulado e tornando-o mais estável. A tecnologia ainda possibilita mascarar sabores ou odores indesejáveis e facilitar o manuseio do material do núcleo (DESAI; PARK, 2005).

Na indústria de alimentos a microencapsulação tem uma vasta aplicação, sendo utilizada para revestir componentes e ingredientes como: gorduras, acidulantes, corantes, vitaminas, aromas e sabores, como também é utilizado para encapsular compostos bioativos, enzimas e bactérias probióticas (DESAI; PARK, 2005).

Para obtenção de um produto com excelentes características funcionais é fundamental que se conheça previamente os polímeros que serão utilizados como material de parede na elaboração das microcápsulas, assim como os métodos físicos, químicos ou físico-químicos usados para microencapsular, para evitar ou favorecer possíveis interações em solução, ou conformação estrutural indesejada (JONES; McCLEMENTS, 2010). De acordo com Anal e Singh (2007), alguns aspectos são desejados na escolha do material de parede tais como: resistência, impermeabilidade, flexibilidade e estabilidade, além de ser compatível, porém

imiscível ao material encapsulado e ser capaz de formar uma camada coesa com o material ativo.

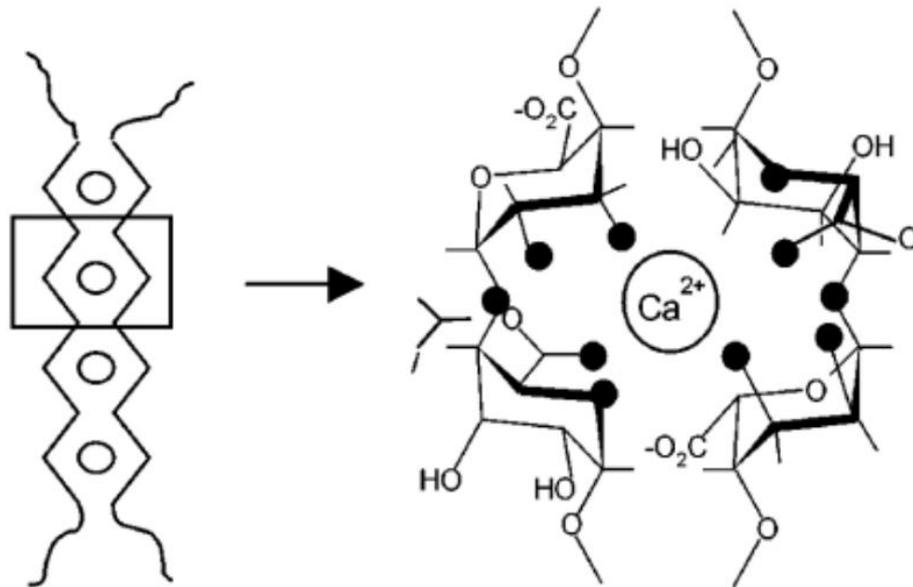
O método ou a combinação de métodos a serem utilizados devem ser cuidadosamente escolhidos para uma eficiente microencapsulação. Diversas técnicas disponíveis produzem cápsulas com finalidades/propriedades diferentes, e entre elas as principais são spray drying, spray cooling, leite fluidizado, co-cristalização, liofilização, coacervação simples e complexa, gelificação iônica e a combinação de métodos incluindo a gelificação iônica associada à interação eletrostática (WANDREY et al., 2010).

3.2 GELIFICAÇÃO IÔNICA

A produção de micropartículas por gelificação iônica é baseada na capacidade de polissacarídeos aniônicos sendo os mais utilizados a pectina e alginato que formam um gel na presença de íons como o cálcio (BUREY et al., 2008).

A gelificação iônica é convencionalmente descrita em termos do modelo denominado caixa de ovos, que caracteriza a formação desta rede de gel. Nesse modelo, a ligação entre grupos carboxílicos presentes nos ácidos gulurônico ou galacturônico, no alginato e na pectina respectivamente, em pH acima de seus valores de pKa e íons cálcio faz com que ocorra um entrelaçamento de cadeias de alginato ou pectina, promovendo a formação de um hidrogel com uma estrutura de rede tridimensional conforme mostrado na Figura 1 (WANG et al., 2006).

Figura 1 - Esquema representativo do modelo “caixa de ovos”. Os pontos negros representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação com os íons cálcio



Fonte: BRACCINI; PÉREZ, 2001.

Há dois métodos pelos quais a gelificação iônica pode ocorrer, a gelificação iônica externa e a interna. A gelificação externa, largamente utilizada, envolve a introdução de uma solução polimérica negativamente carregada em uma solução iônica carregada positivamente, sob agitação constante, com a gelificação ocorrendo através da difusão de cátions para dentro da solução do hidrocolóide, formando cápsulas de diferentes formas e tamanhos, em função do correto ajuste das condições de produção, incluindo concentração do íon, do polissacarídeo, do bico atomizador, velocidade de gotejamento e condições de agitação (CHAN et al., 2006).

Na gelificação interna a produção de partículas se dá pela liberação de íons cálcio, inicialmente na forma de um sal insolúvel, na solução/emulsão do polissacarídeo contendo material ativo. O processo de gelificação é iniciado a partir da mudança de pH do sistema, em que a adição de uma solução ácida diminui o pH, provocando a liberação dos íons cálcio, permitindo assim a complexação do cálcio com os grupos carboxílicos (BUREY et al., 2008; VILLENA et al., 2009).

As partículas de gel são geradas em duas etapas, o desenvolvimento da gota (por extrusão ou atomização) e o endurecimento da mesma. Quando formadas, as partículas permanecem sob agitação por um período denominado tempo de maturação, no qual, lenta e progressivamente as ligações cruzadas desenvolvem-se da superfície para o interior da partícula gelificada (MESTDAGH; AXELOS, 1998; RÉ, 2000; ROCHA, 2001). Segundo Racoviță et al. (2009) a espessura da parede da cápsula, e conseqüentemente a sua resistência à ruptura mecânica está diretamente relacionada com o tempo de permanência das partículas na solução iônica. Para que as partículas obtenham resistência mecânica constante e estabilidade, faz-se necessário aproximadamente 20 minutos de contato com a solução iônica.

Alguns aspectos podem influenciar a gelificação, definindo a cinética da formação do gel, o volume e a estabilidade das cápsulas, bem como a concentração do cátion, a força iônica e o pH. Além disso, o processo de gelificação iônica é considerado uma técnica simples, de condições brandas (ocorre em meio aquoso), rápida e de baixo custo (MESTDAGH; AXELOS, 1998).

De acordo com Patil et al. (2010), as partículas produzidas a partir da gelificação iônica são sensíveis a valores de pH extremos e apresentam como principal característica a matriz de gel porosa, que permite a entrada e saída de substâncias para o núcleo da cápsula. Conseqüentemente, a porosidade dessas partículas influenciará na quantidade de material de recheio retido e no tempo de liberação do mesmo.

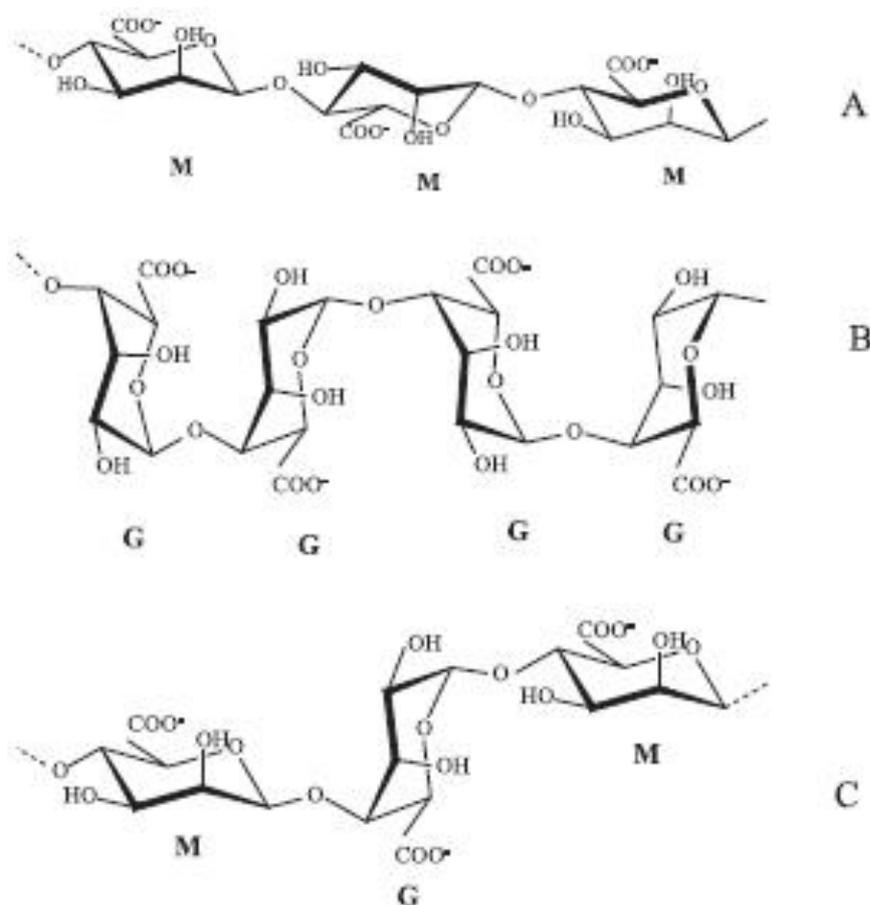
3.2.1 Alginato

O alginato é um hidrocolóide que possui alta capacidade de formar filmes, géis e hidrogéis. Obtido principalmente de algas marinhas marrons como *Laminaria digitata* e *Macrocystis pyrifera*, o alginato é um componente natural, biodegradável amplamente utilizado como material de parede na microencapsulação (PASQUALIM et al. 2010).

Quimicamente, o alginato possui uma estrutura linear de resíduos de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), na forma de sal de sódio e unidos através de ligações glicosídicas α 1-4. As propriedades do alginato em solução, são

influenciadas fortemente pela disposição dos resíduos, que se dá em blocos homopoliméricos (MM e GG) intercalados por blocos heteropoliméricos (MG) ao longo da cadeia (STEPHEN et al., 2006) como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G- e dos blocos heteropoliméricos MG-, que constituem a molécula de alginato, Em (A) tem-se uma sequência M-M; em (B) uma sequência G-G e em (C) um sequencia M-G-M.



Fonte: Adaptado de SMIDSRØD,1970.

Um aspecto relevante do alginato é sua capacidade de formar géis pela reação com cátions divalentes, como íons cálcio. Micropartículas de alginato podem ser produzidas por extrusão a partir de uma solução de alginato de sódio em contato com uma solução contendo cátions divalentes. Desta forma com a troca de íons

sódio dos ácidos gulurônicos com o cátion divalente, a gelificação é obtida (GOMBOTZ; WEE, 1998; BLANDINO et al., 1999).

Na microencapsulação o alginato é amplamente utilizado como material de parede por apresentar benefícios como facilidade de manuseio, ambiente relativamente inerte e aquoso dentro da matriz, baixo custo (GIBBS et al., 1999; DOUMÈCHE et al., 2004), além de não ser tóxico (PREVOST; DIVIES, 1992; CHANDRAMOULI et al., 2004; DING; SHAH, 2007).

Entretanto algumas limitações podem inviabilizar a utilização do alginato, como a elevada porosidade das partículas, o tamanho da cápsula formada, a concentração de alginato e a quantidade de material de núcleo a ser encapsulada (CHANDRAMOULI et al., 2004; CHÁVARRI et al., 2010; BURGAIN et al., 2011). Para contornar tais efeitos nas micropartículas produzidas, outro composto polimérico pode ser adicionado revestindo as cápsulas e tornando-as mais estáveis e funcionais (GOUIN, 2004).

3.3 INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA

A interação eletrostática é uma técnica amplamente utilizada quando combinada a outros métodos, promovendo a micropartícula uma maior proteção. Segundo Patil et al. (2010), a interação eletrostática é uma técnica de recobrimento que possibilita melhorar a estabilidade de partículas obtidas pela gelificação iônica, por meio da interação iônica de biopolímeros. Este processo irá modificar a estrutura do gel, de forma a garantir o aproveitamento das vantagens da composição química de cada composto ou pela complexação com polieletrólitos catiônicos como proteínas.

Neste processo, os biopolímeros que possuem cargas opostas interagem entre si, sendo comumente utilizada uma molécula proteica como polieletrólito positivo e uma molécula de polissacarídeo como polieletrólito negativo (JUN-XIA et al., 2011).

Na interação iônica os biopolímeros de cargas opostas afetam as propriedades do hidrogel positivamente, formando os chamados complexos de polieletrólitos e tornando-se uma alternativa à formação de hidrogéis reticulados

covalentemente (BERGER et al., 2004; PATIL et al., 2010). Segundo Anal e Stevens (2005) a reticulação dos hidrogéis através desta técnica evita a aplicação de agentes químicos (glutaraldeído e/ou etileno) com potencial tóxico reduzindo assim, os efeitos indesejáveis dos reagentes.

A interação eletrostática pode ocorrer em solução aquosa e produz espontaneamente complexos de proteínas e polissacarídeos. Algumas características dos biopolímeros podem influenciar a formação dos complexos, tais como densidade de carga, massa molar, concentração, natureza química e estequiometria, assim como por condições ambientais como pH, força iônica e tipo de íon (DE KRUIF et al., 2004; TOLSTOGUZOV, 2003).

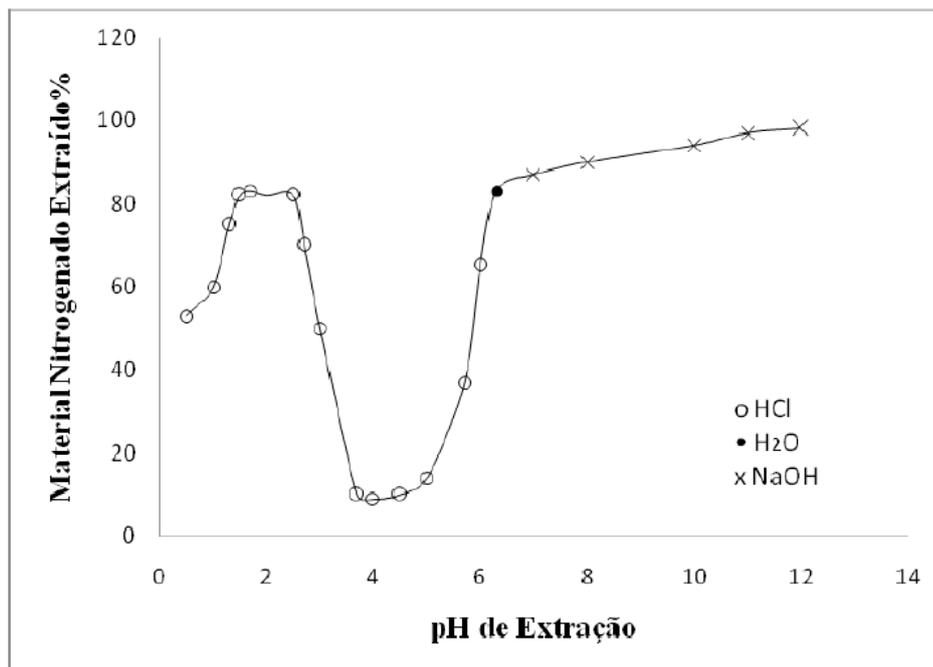
O domínio destes aspectos e o controle das interações entre as duas macromoléculas são fundamentais para a formação de uma ou mais camadas protetoras na superfície do hidrogel, com o intuito de reduzir a porosidade da partícula, alterar sua resistência mecânica e de barreira como a permeabilidade (PENICHE et al., 2004; PATIL et al., 2010).

3.3. 1 Proteínas da Soja

As proteínas presentes na soja são de elevada qualidade nutricional, podendo ter sua composição influenciada de acordo com as condições climáticas, tipo de solo, entre outros fatores, e estão armazenadas no farelo de soja após a extração do óleo, o qual pode conter até aproximadamente 52% de proteínas, provenientes do corpo proteico do cotilédone (MARTINEZ et al., 2011).

Em sua maioria, as proteínas da soja são classificadas como globulinas e caracterizam-se por serem insolúveis em meio aquoso no seu ponto isoelétrico, entretanto em água ou soluções salinas diluídas em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico (pH 4,5) apresentam-se solúveis (Figura 3) (WOLF, 1977).

Figura 3 - Gráfico da curva de solubilidade da proteína de soja em função do pH



Fonte: WOLF, 1977.

As proteínas predominantes são as β -conglucininas e glicininas que apresentam um coeficiente de sedimentação de 7S (massa molecular de 180-210 kDa) e 11S (massa molecular de 350 kDa) respectivamente, e que compreendem aproximadamente 80% do total de proteínas. Outras proteínas presentes, porém, em quantidades bem menores são a 2S, 9S e 15S (VELASQUEZ; BHATHENA, 2007).

Segundo Renkema et al. (2002) a β -conglucina, é uma glicoproteína trimérica composta por três subunidades: α , α' e β , enquanto a glicinina, é formada por 12 subunidades, sendo 6 de caráter ácido e 6 de caráter básico, ligadas por ligações dissulfeto.

As proteínas em maior quantidade podem formar gel e de acordo com Kinsella e Soucie (1989) o mecanismo de formação do gel é o mesmo para as duas frações proteicas (7S e 11S): agregação das partículas de proteína, no qual, o tamanho dos agregados depende do pH, da temperatura de aquecimento, do tamanho e da forma das moléculas de proteína e do rearranjo molecular.

A glicinina é caracterizada por formar géis mais firmes e elásticos, devido a estrutura de sua rede proteica, bem como pelas numerosas ligações dissulfeto existentes em sua molécula (CHEFTEL et al., 1989), enquanto β -conglucina apresenta um gel de menor rigidez em temperaturas acima de 75 °C. Em altas

temperaturas mais sítios reativos são gerados na superfície da molécula de proteína, principalmente sítios hidrofóbicos, formando um gel desordenado (NAGANO et al., 1992).

De acordo com Keerati-u-rai e Corredig (2010) a β -conglucina apresenta menor estabilidade ao calor em relação à glicina, com temperaturas de desnaturação de aproximadamente 69 °C e 85 °C, respectivamente. Sendo assim o tratamento térmico acarreta na dissociação, desnaturação e agregação das frações, 7S e 11S, que em concentração adequada resultam no fenômeno da gelificação (ORTIZ et al., 2004). Este comportamento associado com o alto valor nutricional da soja tem atraído pesquisas voltadas a aplicações na indústria alimentícia.

3.3.2 Concentrado proteico de soja

O Concentrado proteico de soja é obtido a partir do farelo desengordurado, também conhecido por “farelo branco”, submetido a um processo de extração adicional (LUSAS; RIAZ, 1995). No processo de produção do CPS os grãos integrais de soja têm as suas cascas, o óleo, os oligossacarídeos não-amiláceos e as proteínas de armazenamento removidos. A extração da proteína é realizada por meio da imersão dos flocos de soja extrusados em solução álcool-hidratada (BELLAVAR; SNIZEK, 1999; BERTOL et al., 2001), o resultado final deste processo é um produto com 65% proteína bruta na matéria seca (BERTOL et al., 2001; DEAK et al., 2008).

A legislação brasileira estabelece conteúdo mínimo 68,0 % (g/100g) de proteínas para o CPS, segundo o a Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005, Regulamento Técnico para Produtos Proteicos de Origem Vegetal (BRASIL, 2005)

Sob o ponto de vista nutricional o concentrado proteico de soja é uma boa fonte de proteína, mas sua aceitação como ingrediente proteico pela indústria de alimentos não se deve apenas às suas qualidades nutricionais, mas também às suas propriedades funcionais que comumente têm maior valor tecnológico e definem as aplicações comerciais. Quando aplicadas em alimentos substituem proteínas convencionais, devendo manter ou melhorar a qualidade e aceitabilidade dos

produtos aos quais foram incorporados (HUA et al., 2005; KINSELLA et al., 1985). Atua assim, como ingrediente funcional numa ampla e sempre crescente faixa de aplicação em alimentos.

3.4 COMPLEXAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM PROTEÍNAS

A utilização de técnicas combinadas na microencapsulação vem sendo amplamente explorada em especial utilizando proteínas de origem animal. A complexação de proteína nas partículas acarreta benefícios que agregam e melhoram a propriedade de superfície, favorece a liberação controlada e principalmente protege ativos funcionais e aumenta sua estabilidade e biodisponibilidade (KHEIREDDIN et al., 2013). Segundo Hirsh e colaboradores (2013) o recobrimento proteico nas partículas é aplicável em diversas áreas como a de biossensores, diagnóstico de doenças, dispositivos biomédicos, biorreatores e processamento de alimentos apresentando grandes vantagens.

Na área de alimentos, estudos permitiram identificar que partículas de alginato que apresentavam porosidade nas paredes, quando aderida à camada proteica tiveram a porosidade diminuída (BURGAIN et al., 2011; KRASAEKOOPT, et al., 2003; RAJAM et al., 2012). Outros autores relatam na literatura a utilização de proteína do soro do leite em partículas de alginato e avaliaram a sobrevivência de *Lactobacillus plantarum* em condições gastrointestinais (RAJAM et al., 2012), proteína do soro de leite em partículas de pectina produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática (SOUZA et al., 2012) e proteína da clara de ovo e do soro do leite em micropartículas de alginato e pectina (TELLO et al., 2015).

A formação de complexos entre pectina e proteínas do soro do leite também foi avaliada por Croguennoc et al. (2001a), Kazmierski et al. (2003), Neiryneck et al. (2004) e Croguennoc et al. (2001b). Já Girard et al. (2002) observaram alta adsorção de β -lactoglobulina (96%) na produção de coacervados de pectina de baixo teor de esterificação, enquanto Aguilar et al. (2015) estudaram a produção de micropartículas e filmes de alginato-pectina adsorvidos com proteína do leite e do ovo.

Comparativamente, pela maior solubilidade e menor hidrofobicidade, os trabalhos de literatura utilizaram mais proteínas animais, entretanto faz-se necessário uma busca por novos materiais proteicos vegetais que possam ser aplicados nas partículas ampliando as opções e até mesmo trazendo novas funcionalidades.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento deste estudo foram: alginato de sódio de alto peso molecular e alto conteúdo de ácido gulurônico (lote GA 1006403, PROTANAL RF 6650, Viscosidade 400 - 600 mPas 20°C, FMC Biopolymer, Campinas-SP, Brasil); concentrado proteico de soja (Bremil, Arroio do Meio-RS, Brasil); óleo resina de páprica (Citromax, Guarulhos, São Paulo, Brasil); corante coomassie brilliant blue Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA); cloreto de cálcio P.A (lote 205338, Synth, Diadema-SP, Brasil); ácido clorídrico P.A 0,1M (lote 20905G, Alphatec, São José dos Pinhais-PR, Brasil), hidróxido de sódio a 50% (lote 22816, Alphatec, São José dos Pinhais-PR, Brasil), ácido sulfúrico P.A (lote 20628M, Alphatec, São José dos Pinhais-PR, Brasil); citrato de sódio (lote 23739 Alphatec, São José dos Pinhais-PR, Brasil); éter de petróleo PA (lote 21673, Alphatec, São José dos Pinhais-PR, Brasil) e água destilada e deionizada.

4.2 MÉTODOS

O estudo foi conduzido nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Câmpus Londrina em parceria com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e o Cereal Chocotec - Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas, SP, onde parte das análises foi realizada. Todas as determinações foram feitas pelo menos em duplicata, com exceção das avaliações morfológicas.

4.2.1 Caracterização físico-química dos biopolímeros

O concentrado proteico de soja e alginato foram caracterizados em relação à umidade, cinzas e proteínas segundo a metodologia da Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2006). A umidade foi determinada por secagem em estufa a temperatura de 105 °C por 5 horas até a obtenção de massa constante determinada gravimetricamente. Os teores de cinzas foram obtidos através da incineração da amostra em mufla por 5 h. Para a quantificação de proteína na amostra, foi realizada a metodologia de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,25.

4.2.2. Determinação do Potencial Zeta dos biopolímeros

O potencial zeta foi determinado em soluções diluídas (0,2% m/m) do concentrado proteico de soja e do alginato, bem como de suas partículas. As condições são descritas nos itens subsequentes. Todas as determinações do potencial Zeta foram realizadas no equipamento Zetasizer modelo Nano-Z (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.) no laboratório Central do Departamento de Tecnologia de Alimentos, FEA, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.

4.2.2.1 Potencial Zeta das soluções e partículas de alginato com e sem recobrimento proteico

Foram determinados o potencial zeta das soluções do concentrado proteico de soja 2,5% (m/m), nos pHs 3,5 e 7,0, do alginato 2% (m/m) e das micropartículas com e sem recobrimento proteico. O pH das soluções foi ajustado, utilizando ácido clorídrico (HCl) 0,1 N ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N. As partículas foram produzidas conforme item 4.2.4. e as amostras obtidas foram diluídas para a concentração de 0,2% (m/m) e submetidas à agitação em homogeneizador Turrax

(T-18, IKA, Works do Brasil, RJ, RJ, Brasil), a 15000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente de acordo com procedimento descrito por Doherty et al. (2011).

4.2.3 Elaboração da solução de concentrado proteico de soja

Inicialmente, uma solução aquosa de concentrado proteico de soja 2,5% (m/m) foi preparada com água deionizada a 40 °C em agitador magnético (IKA , modelo C-MAG-HS 7, Campinas, BR). Ajustou-se o pH para 11 com NaOH 0,1 N, mantendo-se o sistema sob agitação magnética por 30 min. Posteriormente a solução foi ajustada a pH 3,5 e 7,0 com ácido clorídrico (HCl) 0,1 N ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N. Ambas as soluções foram mantidas sob agitação a temperatura ambiente por mais 30 minutos. Posteriormente as soluções foram mantidas em refrigeração por 24 h para separação de fases. Após este período de decantação a frio, o sobrenadante, fração que contém as proteínas solúveis, foi retirado com pipeta e reservado para etapa de recobrimento das partículas com proteína por interação eletrostática, item 4.2.6. A quantidade total de proteínas nos sobrenadante foi determinada de acordo com metodologia de Kjeldahl (AOAC, 2006), utilizando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,25.

4.2.4 Produção de partículas de alginato por gelificação iônica

A solução aquosa de alginato (2% m/m) foi emulsificada com óleo resina de páprica 2% m/m (1:9, óleo resina : óleo comercial de girassol) por 3 minutos a 14.000 rpm em homogeneizador Turrax (modelo IKA T-18, Rio de Janeiro, BR). A adição da mistura óleo resina:óleo de girassol foi utilizada para conferir cor às partículas transparentes de gelificação iônica, facilitando sua observação durante a produção das partículas e posterior caracterização morfológica. A emulsão foi atomizada sobre soluções de cloreto de cálcio nas concentrações de 0,8%, 1,6% e 2,4% m/m mantidas sob agitação magnética constante. A atomização se deu através

de um bico atomizador duplo fluido (LAB MAQ, Ribeirão Preto, SP, Brasil) de 0,7 mm de diâmetro, com altura de 12 cm entre a saída do bico e a solução de cloreto de cálcio, pressão do ar de 15 kgf/cm² e bomba peristáltica (velocidade de 160 mL/hora) que conduziu a emulsão até o bico (MUKAI-CORRÊA, 2003), condições ajustadas visando a obtenção de partículas esféricas. A emulsão foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente e após a atomização, as micropartículas foram mantidas por mais 30 minutos em banho iônico (cloreto de cálcio) para cura, ou seja, para completar a gelificação iônica pela difusão de íons cálcio até o centro das mesmas. Posteriormente, as partículas foram lavadas abundantemente com água deionizada e separadas em peneira de malha de aço, diâmetro de 53 µm (Bertel, Caieiras-SP, Brasil). Dois processamentos independentes para cada nível de cálcio descrito acima, foram efetuados.

4.2.5 Determinação do teor de cálcio das partículas de alginato

O conteúdo de cálcio nas partículas foi determinado utilizando espectrofotômetro de absorção atômica (Analytic Jena AG-NOVAA300, Jena, Alemanha) e uma solução padrão de cálcio (1000 µg/mL, SCP Science, lote S120221015, Quebec, Canadá) no modo de absorção com detector de chama ar-acetileno. Amostras de partículas úmidas (400 mg) foram dissolvidas em 25 mL de solução de citrato de sódio a 3% (m/v) (SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2008). Avaliações preliminares indicaram que a adição de citrato de sódio, utilizado para solubilizar as partículas gelificadas não interferiu na determinação do conteúdo de cálcio.

4.2.6 Recobrimento das partículas de gelificação iônica com proteínas por interação eletrostática

As partículas de alginato obtidas no item 4.2.4 foram submetidas à interação eletrostática. Uma alíquota de 50 g de partículas úmidas de alginato foram transferidas para 200 mL das soluções contendo proteínas solúveis obtidas a partir do concentrado proteico de soja nos pHs 3,5 e 7,0 conforme item 4.2.3. As partículas foram mantidas nas soluções contendo as proteínas solúveis sob agitação magnética durante 30 min, à temperatura ambiente. Posteriormente as partículas foram transferidas para peneiras de malha de aço (diâmetro 53 μm) e lavadas abundantemente com água deionizada previamente ajustada nos pHs correspondentes a solução para a remoção das proteínas não adsorvidas na superfície das partículas. Produções independentes em triplicata foram feitas para cada pH estudado (3,5 e 7,0).

4.2.7 Caracterização das micropartículas

4.2.7.1 Composição proximal

Os conteúdos de umidade, cinzas e proteínas foram determinados segundo metodologia da Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2006). A umidade foi determinada por secagem em estufa a temperatura de 105 °C por 5 h até a obtenção de massa constante. Os teores de cinzas foram obtidos através da incineração das amostras em mufla por 5 h. Para a quantificação de proteína na partícula, foi utilizada a metodologia de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,25.

4.2.7.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas com e sem recobrimento proteico

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das partículas foram obtidos por difração a laser utilizando um equipamento LV950-V2 (Horiba, Kyoto-Japão). As amostras foram previamente dispersas em água deionizada, com valores de pH da água ajustados a 3,5 ou 7,0 no caso das partículas recobertas e foram adicionadas a câmara de amostra, mantida sob agitação em quantidade suficiente para atingir níveis de transmitância adequados aos requerimentos do equipamento. O tamanho médio foi expresso como $D_{0,5}$ e respectivo desvio padrão, sendo realizadas ao menos seis repetições independentes para cada amostra. A polidispersidade foi calculada pelo índice span conforme Equação 1:

$$\text{span} = \frac{(D_{0,9} - D_{0,1})}{D_{0,5}} \quad [\text{Eq.1}]$$

Em que, $D_{0,1}$, $D_{0,5}$ e $D_{0,9}$ correspondem aos diâmetros relativos a 10, 50 e 90% da distribuição de tamanho acumulada.

4.2.7.3 Morfologia das partículas úmidas de alginato com e sem recobrimento de proteínas

Micropartículas úmidas obtidas por gelificação iônica com ou sem recobrimento foram observadas por microscopia óptica (BX4, Olympus, Tokyo, Japão) utilizando objetiva de 10X. As imagens foram obtidas com uma câmera digital (Q - Color 3, Olympus, Tokyo-Japão). Duas formas de iluminação foram utilizadas, a primeira com a fonte de luz convencional vinda da base inferior do microscópio atravessando a lâmina + amostra e atingindo a ocular. A segunda forma utilizou uma fonte de luz de fibra ótica (modelo LGPS, fonte de luz de fibra ótica, Olympus 9095,

Tokyo, Japão) incidindo diretamente sobre a lâmina e amostra. Este artefato visou obter microscopias com efeito tridimensional de profundidade com resultados melhores que a microscopia ótica convencional.

4.2.7.4. Avaliação qualitativa morfológica da adsorção proteica utilizando Coomassie Blue

A adsorção proteica nos valores de pH 3,5 e 7,0 sobre as partículas de gelificação iônica foi tentativamente acompanhada através da coloração/descoloração das partículas com solução de Coomassie Blue, corante específico que se liga às proteínas, de acordo com metodologia para a coloração e descoloração de géis de eletroforese utilizada na separação de proteínas descrita por Laemmli (1970).

4.3 TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados coletados durante a pesquisa foram submetidos à análise estatística utilizando análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias comparadas pelo teste de Tukey, com o auxílio do programa SAS, em nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros foram avaliados com relação às suas propriedades físico-químicas e os resultados da composição proximal estão expressos na Tabela 1. O CPS apresentou $70,5 \pm 0,1\%$ de proteínas, $5,7 \pm 0,5\%$ de umidade e $3,6 \pm 0,1\%$ de cinzas, enquanto o alginato apresentou $10,8 \pm 0,2\%$ de umidade e $28 \pm 2,2\%$ de cinzas.

O percentual de cinzas de $3,6 \pm 0,1\%$ foi inferior ao obtido por Seibel e Beléia (2009) ao avaliarem as características químicas e funcionalidade tecnológica de ingredientes de soja que verificaram no CPS a concentração de $4,8\%$ de cinzas em base seca.

Tabela 1 – Composição proximal do concentrado proteico de soja (CPS) e alginato (ALG) em base seca

Parâmetro	CPS(%)	ALG(%)
Umidade	$5,7 \pm 0,5^*$	$10,8 \pm 0,2$
Proteína	$70,5 \pm 0,1$	ND**
Cinzas	$3,6 \pm 0,1$	$28 \pm 2,2$

*Médias e desvio padrão

**Não determinado

Fonte: Dados da pesquisa

Verificou-se que o teor de proteína para o CPS, de $70,5 \pm 0,1\%$ foi superior ao estabelecido para esse tipo de produto, que segundo Deak et al. (2008) devem apresentar valores acima de 65% , além de estar dentro do limite estabelecido pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde (ANVISA/MS) através da RDC 268, de 23 de setembro de 2005, que determina para o CPS uma concentração mínima de 68% (BRASIL, 2005).

Kumar et al. (2002) e colaboradores, no desenvolvimento de adesivos e plásticos à base de proteína de soja, relataram concentrações de 64% de proteína no concentrado proteico de soja. Segundo Lee et al. (2003) ao avaliarem as

características de solubilidade proteica de produtos comerciais de proteína de soja, quantificaram teores máximos de proteínas em concentrados de 66,1% .

O conteúdo de umidade do alginato ($10,8 \pm 0,2\%$) aproximou-se ao encontrado por Costa (2014) ($12,51 \pm 0,07\%$) ao caracterizar micropartículas recobertas com isolado proteico de soja, além de estar de acordo com o sugerido pela FAO (Food and Agriculture Organization), encontrando-se na faixa de 10% - 13%. Já o teor de cinzas ($28 \pm 2,2\%$) foi superior ao apresentado neste mesmo estudo cerca de $23,69 \pm 2,63\%$ de cinzas, podendo ser justificado devido ao alginato ser um sal sódico derivado do ácido algínico (NAKAMURA et al., 1995).

De acordo com Rabiskova e Valaskova (1998) o processo de formação de partículas é dependente das propriedades físico-químicas dos componentes da solução. Desta forma a caracterização do material de parede contribui no processo de microencapsulação, já que sua composição poderá interferir diretamente na técnica.

5.2 POTENCIAL ZETA

5.2.1 Determinação do potencial Zeta das soluções dos biopolímeros

A determinação do potencial Zeta dos biopolímeros permitiu identificar a quantidade de cargas em solução do alginato e do concentrado proteico de soja, possibilitando avaliar a possibilidade de interação eletrostática entre os materiais utilizados neste estudo. Os valores de potencial Zeta das soluções de alginato e concentrado proteico de soja nos pHs 3,5 e 7,0 estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Potencial Zeta das soluções de biopolímeros

	Alginato	CPS pH 3,5	CPS pH 7,0
Potencial Zeta (mV)	$-79,6 \pm 2,7^a$	$27,6 \pm 1,3^b$	$-13,07 \pm 1,0^c$

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre as médias obtidas através do teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa

A solução de alginato de sódio apresentou potencial Zeta negativo -79,6 mV (pH 6,7), resultado superior em módulo, porém próximo, ao obtido por Beraldo (2016), -66,7 mV (pH 7) ao produzir micropartículas de alginato tendo como cobertura gelatina e colágeno com diferentes graus de hidrólise. Valores do potencial Zeta de -68 mV em pH 7 e de -10 mV em pH 2,0 foram obtidos para soluções de alginato (ZHANG et al., 2016).

O potencial Zeta negativo do alginato justifica-se, pelo fato deste composto apresentar nos blocos D-manurônico e L-gulurônico grupamentos carboxilas carregados negativamente (COO⁻), que apresentam valores de pKa ao redor de 3,5, estando portanto dissociados na solução de alginato sem ajuste de pH (~ 6,0) (BAJPAI;TANKHIWALE, 2006).

A solução de CPS em pH 3,5 apresentou potencial Zeta positivo, 27,6 mV, em concordância com o valor do ponto isoelétrico do CPS, ~4,5 (SGARBIERI, 1996), enquanto em pH 7,0 apresentou carga negativa -13,07 mV, demonstrando uma redução de eletronegatividade com o aumento do pH. Costa (2014), na produção de micropartículas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e Isolado proteico de soja (IPS) encontrou resultado semelhante ao avaliar solução de proteína de soja no pH 3, 24,4 mV, enquanto Santiago et al. (2008) determinou um valor de potencial Zeta para solução de proteína de soja a pH 7,4 de -20,0 mV. Em pH 3,5 o potencial Zeta apresenta carga positiva enquanto em pH 7,0 o potencial Zeta apresentou carga negativa, conforme esperado.

Segundo Fennema (1996), Sgarbieri (1996) e McClements e Decker (2000) a proteína apresenta um excesso de cargas negativas (-COO⁻) em qualquer pH acima do seu ponto isoelétrico (pI) enquanto parte dos grupos amina tornam-se neutros (-NH₂). A medida que se eleva o pH da solução, a proteína perde prótons e a intensidade ou número de cargas negativas aumentará. Quando a faixa de pH encontra-se abaixo do pI os grupamentos amina das proteínas estarão carregados positivamente (-NH₃⁺) e os grupos carboxilas estarão neutros (-COOH). No ponto isoelétrico, a carga elétrica total das proteínas torna-se zero, pois há um equilíbrio entre os grupos amina (-NH₃⁺) e os grupos carboxilas (-COOH).

De acordo com McClements (2006) em interfaces, interações eletrostáticas atrativas podem ser usadas para criar sistemas/artefatos com estabilidade ao estresse do ambiente ou com novas características de liberação controlada, e o conhecimento da natureza das interações pode ser usado para desenvolver

estruturas e propriedades físico-químicas em sistemas alimentícios. Ainda de acordo com o autor, as principais interações não covalentes entre proteínas e polissacarídeos são: interações eletrostáticas, exclusão estérica, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, que dependem do tipo de biopolímeros envolvidos (massa molecular, densidade de carga x perfil de pH, flexibilidade e hidrofobicidade), composição da solução (pH e força iônica) e das condições do entorno (temperatura e tipo de agitação).

A avaliação do comportamento eletroestático das soluções de polissacarídeo e proteína torna-se importante para identificar as condições onde a interação eletrostática entre os diferentes tipos de materiais possa ser otimizada (COSTA, 2014). Nesse contexto a determinação do potencial Zeta permitiu determinar a carga elétrica disponível em solução nos biopolímeros e desta forma, indicar o pH que favorece a interação eletrostática entre o alginato e o CPS.

Comparando-se o valor do potencial Zeta das soluções de biopolímeros, o alginato é muito mais eletronegativo, determinado por seus grupos carboxílicos. A solução de CPS a pH 3,5 apresentou carga positivas devido a presença de grupamentos amina e, portanto, uma maior possibilidade de interação com os grupamentos funcionais das partículas de alginato do que a solução de CPS no pH 7,0 carregada negativamente.

Considerando que a interação eletrostática será a principal forma de interação para a associação proteína-polissacarídeo, as diferenças de carga em termos de potencial Zeta podem determinar estequiometrias otimizadas de interação proteína-polissacarídeos, de forma a se conseguir carga zero no sistema no ponto ótimo de interação. Um modelo para interação proteína-polissacarídeo através da carga negativa do polissacarídeo e da carga positiva líquida da proteína foi anteriormente proposto, indicando que o complexo formado pode ser solúvel ou insolúvel dependendo do pH e da relação fração mássica entre os biopolímeros utilizados (TOLSTOGUSOV, 2003).

5.2.2 Potencial Zeta das partículas de alginato com e sem recobrimento proteico

Os valores de potencial Zeta das partículas de alginato obtidas em três concentrações distintas de cloreto de cálcio em solução (0,8%, 1,6% e 2,4% m/m) visou avaliar uma possível influência do teor de cálcio em solução e do teor de cálcio transferido às partículas alterando, portanto, a carga negativa disponível nas partículas e, conseqüentemente a adsorção proteica sobre as mesmas nos dois valores de pH estudados. Na tabela 3 estão apresentados os valores dos potenciais Zeta das partículas com e sem o recobrimento proteico, expressos em mV nas concentrações de cálcio e pH estudados.

Tabela 3 - Potencial Zeta das micropartículas produzidas em diferentes concentrações de cloreto de cálcio

Conc. de CaCl ₂	Partícula sem recobrimento	*CPS pH 3,5	**CPS pH 7,0
0,8	-18,56±0,32 ^{ab}	-9,6±0,75 ^{bA}	-25,27±0,59 ^{bC}
1,6	-24,97±2,17 ^{bB}	-17,4±1,20 ^{cA}	-29,37±1,78 ^{cA}
2,4	-21,03±1,88 ^{abB}	7,30±0,2 ^{aA}	-19,13±1,16 ^{ab}

*Partículas de alginato recobertas com concentrado proteico de soja (CPS) no pH 3,5

**Partículas de alginato recobertas com concentrado proteico de soja (CPS) no pH 7,0

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre as médias obtidas através do teste Tukey (p < 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa

As micropartículas sem recobrimento proteico apresentaram os potenciais Zeta -18,56 ± 0,32 mV; -24,97 ± 2,17 mV e -21,03 ± 1,88 mV nas amostras 0,8%, 1,6% e 2,4% respectivamente. Os resultados não diferiram significativamente entre as amostras 0,8% e 2,4% e 1,6% e 2,4%, enquanto as amostras 0,8% e 1,6% apresentaram diferença significativa. Yeung et al. (2016) encapsularam *Bifidobactérias* e obtiveram potenciais Zeta variando de -4,2 a -9,4 mV para partículas de alginato encapsulando *B. infantis* e -2,6 a -4,4 mV para partículas de alginato quando *B. Longum* foi encapsulado.

Zheeb et al. (2015) encapsularam um triglicerídeo de cadeia média (MIGLYOL® 812) em micropartículas de alginato de cálcio utilizando um surfactante não iônico (Tween 60) e obtiveram potenciais Zeta para as partículas gelificação

iônica de ~ -2,5 mV a pH 2, ~ -10 mV a pH 5, ~ -18 mV a pH 6 e ~ -37 mV a pH 11. Os valores obtidos no presente trabalho para as partículas de gelificação iônica nos três níveis de cálcio testados são semelhantes aos obtidos por Zheeb et al. (2015).

Ao se comparar o valor do potencial Zeta da solução de alginato (Tabela 2) e os resultados obtidos para as partículas de gelificação iônica (Tabela 3), verifica-se uma diminuição significativa da carga líquida nas partículas, indicando a complexação dos grupos carboxílicos com os íons cálcio durante o processo de gelificação iônica. Segundo Maestrelli et al. (2008) no processo para obtenção de micropartículas por gelificação iônica, a interação dos grupos negativos do polissacarídeo com os íons Ca^{2+} provoca a redução da carga líquida do sistema devido a utilização dos grupos carboxílicos livres.

Os valores de potencial Zeta após recobrimento proteico em ambos os tratamentos diferiram entre si. Em pH 7,0 (Tabela 3) os resultados obtidos foram semelhantes aos das amostras sem recobrimento proteico, apresentando partículas com elevada carga negativa.

O excedente de carga livre eletronegativa pode ser justificado devido a solução proteica em pH 7,0 apresentar potencial Zeta também carregado negativamente, $-13,07 \pm 1,0$ mV, conseqüentemente a interação eletrostática entre os biopolímeros neste tratamento será menor devido as partículas de gelificação iônica e a solução proteica, acima de seu ponto isoelétrico apresentarem cargas de mesmo sinal, considerando que a principal interação entre as partículas e o CPS será devido a interações eletrostáticas. Embora todas as partículas recobertas com CPS a pH 7,0 tenham apresentado valores de potencial Zeta negativos, não se observou uma variação proporcional nos valores do potencial Zeta quando concentrações crescentes de íons cálcio (0,8; 1,6 e 2,4%) foram utilizadas.

De acordo com De Vos et al. (2007) partículas gelificadas podem apresentar um excedente de carga negativa, pois nem todos os grupos carboxílicos interagem com os íons cálcio permitindo a associação com polieletrólitos carregados positivamente. A interação dos grupos funcionais catiônicos das moléculas de proteína com os grupos aniônicos dos polissacarídeos produzem complexos eletrostáticos, o que se torna possível quando as partículas e solução dos biopolímeros estão em um meio no qual o pH promove a formação de cargas líquidas opostas (TURGEON et al., 2007).

O desenvolvimento e a estabilidade destes complexos estão diretamente relacionados ao pH, relação estequiométrica proteína: polissacarídeo, densidade de carga, força iônica, concentração e condições de produção como velocidade, temperatura, tempo e modo de agitação (GIRARD et al., 2004; SCHMITT et al., 1998; TOLSTOGUZOV, 1997; YE, 2008). Para Schmitt et al. (1998) nesse processo o pH apresenta papel fundamental através da influência no grau de ionização do grupo funcional da proteína (NH_3^+) e no polissacarídeo (COO^-). Espera-se que a interação eletrostática tenha melhor desempenho quando o pH da proteína estiver abaixo do ponto isoelétrico e acima do pKa do polissacarídeo (MESTDAGH; AXELOS, 1998).

Em relação aos valores dos potenciais Zeta observados para as partículas de gelificação iônica recobertas com CPS em pH 3,5 (Tabela 3), as cápsulas apresentaram a menor carga livre em módulo dos sistemas, 2,4% com $7,30 \pm 0,2$ mV, seguida das amostras 0,8% e 1,6% com $-9,6 \pm 0,75$ mV e $-17,4 \pm 1,2$ mV respectivamente, indicando que ocorreu interação dos grupamentos carboxila do polissacarídeo com os grupamentos amina da proteína devido a diminuição dos valores dos potenciais Zeta. Entretanto, esperava-se que os valores dos potenciais Zeta mudassem de sinal, tornando-se positivos após o recobrimento no pH 3,5 (pH < ponto isoelétrico da proteína), resultado observado somente para a concentração de íons cálcio mais alta (2,4%) em relação as concentrações de cálcio 0,8% e 1,6%.

Valores negativos do potencial Zeta mesmo após o recobrimento com a proteína a pH 3,5 carregada positivamente, podem indicar que a quantidade de proteína utilizada em solução foi baixa para permitir uma adsorção proteica suficiente para ultrapassar as cargas negativas remanescentes nas partículas após a gelificação iônica, invertendo assim o sinal do potencial Zeta após o recobrimento proteico. Adicionalmente, a quantidade de proteína em solução pode ter sido suficiente, porém a adsorção, devido às características das moléculas de grande tamanho das proteínas solúveis do CPS, tenha sido baixa.

A determinação do potencial Zeta de partículas grandes pode apresentar problemas quando a medida é feita em equipamento de medida eletroforético, como utilizado no presente trabalho, que deve estar em um estado coloidal para apresentar mobilidade no campo elétrico durante a medida. De acordo com a fabricante do equipamento (Zetasizer Nano-Z, Malvern Instruments), para que as

partículas não sedimentem durante a leitura, o limite de tamanho recomendado é de 10 μm , muito inferior ao tamanho obtido para as partículas no presente trabalho.

Apesar da restrição, trabalhos na literatura apresentam medidas do potencial Zeta de partículas com tamanhos da mesma ordem de grandeza ou maiores feitas no mesmo equipamento (Zetasizer Nano-Z Malvern Instruments) sem tratamento adicional (ZHANG et al., 2016; ZHEEB et al., 2015). Como alternativa foi adotada a estratégia utilizada por Doherty et al. (2011) conforme descrito em 4.2.2.1, com a diminuição do tamanho das partículas após a adsorção proteica. Embora os desvios das medidas obtidos para as medidas do potencial Zeta das partículas com ou sem proteína adsorvida tenham sido baixos, é possível que a diminuição de tamanho não tenha sido suficiente para permitir uma completa homogeneização da amostra, o que requer trabalhos futuros nesta direção.

5.3 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA SOLÚVEL DO CPS

A extração da proteína solúvel foi possível a partir de estudos preliminares que identificaram o melhor método para sua separação da solução de CPS. Ordóñez et al. (2005) define a solubilidade de uma proteína como a fração proteica que se submetida a forças centrífugas moderadas ou condições específicas não sedimenta, mantendo-se em solução ou dispersão coloidal.

Próximo ao ponto isoelétrico grande parte das proteínas apresenta solubilidade mínima, este comportamento ocorre, principalmente, por não haver repulsão eletrostática e a hidratação iônica é reduzida, favorecendo as ligações proteicas por meio de interações hidrofóbicas e assim sua precipitação. Em pHs superiores ou inferiores ao ponto isoelétrico as proteínas possuem cargas líquidas, provocando a repulsão eletrostática e sua hidratação, promovendo a solubilização principalmente em pH alcalino (DAMONARAN, 2010).

A solução de CPS 2,5% foi ajustada para o pH 11 para maximizar a solubilização proteica, condição baseada na curva de solubilidade da proteína de soja em função do pH (Figura 3), que indica maior solubilidade das proteínas da soja em pH 11, favorecendo a extração de maior quantidade das mesmas.

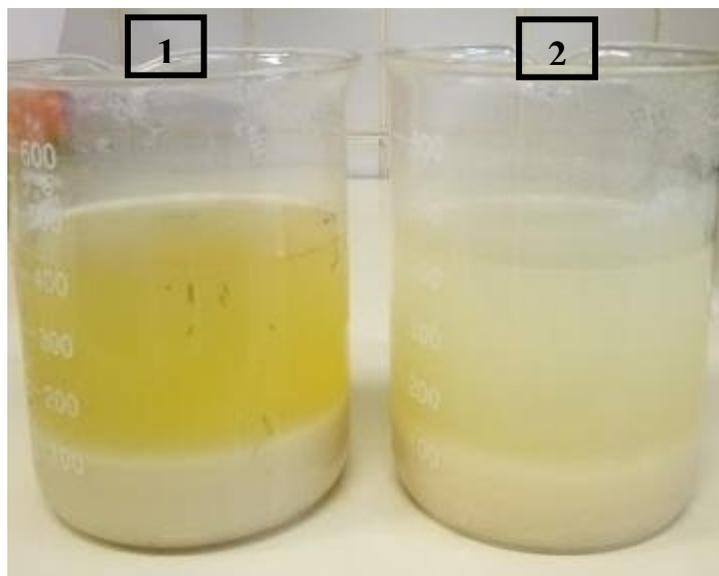
Posteriormente a fração solúvel foi separada em duas porções que foram ajustadas para os pHs 3,5 e 7,0 a serem utilizadas no estudo da adsorção proteica sobre as partículas de gelificação iônica. De acordo com a Figura 3, embora não se atinja a solubilidade apresentada no pH 11, a quantidade de proteína solubilizada é alta. Segundo Fennema (1996) quando o pH do meio é modificado a distribuição dos sítios polares catiônicos, aniônicos e não-iônicos da molécula de proteína são alterados afetando interações água-proteína e proteína-proteína. A solubilidade da proteína é fortemente influenciada por interações de natureza hidrofóbica e iônica. As interações iônicas caracterizam-se por ligações proteína-água que levam ao aumento da solubilidade enquanto as interações hidrofóbicas caracterizam-se pela ligação proteína-proteína, que resulta em uma redução da solubilidade. Desta forma a solubilidade de uma proteína dependerá do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-água.

As soluções, preliminarmente, foram submetidas às técnicas de filtração, centrifugação e decantação. Dentre estas, o método de decantação destacou-se por ser simples e apresentar vantagens econômicas para aplicação em escala industrial, sendo, portanto utilizado para a obtenção da fração proteica solúvel em cada um dos pHs estudados. Após a etapa de decantação os sobrenadantes foram separados para posterior recobrimento proteico.

Na Figura 4 é possível observar a separação de fases das soluções de CPS enquanto a Figura 5 mostra apenas a solução de proteínas solúveis. As soluções nos pHs 3,5 e 7,0 apresentaram coloração branca e amarela respectivamente. Segundo King e Young (1999) compostos de cor como as antoxantinas, presentes nos flavonóis, flavonas, e isoflavonas, são moléculas incolores, brancas ou amarelas. Também conhecidos como flavonóides não antociânicos as antoxantinas são sensíveis ao pH e apresentam coloração amarela em meio alcalino, branco em meio neutro e incolor em meio ácido (ZHAO et al., 2012).

De acordo com Seibel et al. (2018) o grão de soja apresenta em sua composição isoflavonas, que são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides, compostos este encontrados principalmente na soja. As isoflavonas presentes na soja justificam a alteração de cor da solução proteica nos pHs estudados e o comportamento observado é semelhante ao descrito por Zhao et al., (2012) como pode ser verificado na Figura 5.

Figura 4 - Solução 1 CPS pH 7,0 e solução 2 CPS pH 3,5



Fonte: Autoria própria

Figura 5 - Solução de proteína solúvel do CPS nos pHs 3,5 e 7,0



Fonte: Autoria própria

Segundo Nogueira (2013) a turbidez da solução proteica observada no pH mais baixo pode ser explicada pelo excedente de cargas positivas. Há também a possibilidade de um excesso de proteína estar parcialmente complexada, resultando em aglomerados que não sedimentam gerando a turbidez.

O percentual de proteínas solúveis presentes nas soluções a pH 3,5 e 7,0 em relação a proteína total inicial está apresentado na Tabela 4, observando-se que os resultados diferiram significativamente.

Tabela 4 - Composição de proteína nas soluções de CPS pH 3,5 e 7,0

Proteína solúvel (%)	CPS pH 3,5	CPS pH 7,0
		51±0,9 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre as médias obtidas através do teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa

5.4 TEOR DE CÁLCIO EM PARTÍCULAS DE ALGINATO

O conteúdo de cálcio foi determinado nas micropartículas por gelificação iônica e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Teor de cálcio em partículas de alginato produzidas por gelificação iônica

Partículas de Alginato	Cálcio mg/L
0,8% CaCl ₂	137,3±3,1 ^a
1,6% CaCl ₂	142,7±2,3 ^a
2,4% CaCl ₂	162,0±3,5 ^b

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias obtidas através do teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa

Os conteúdos de cálcio não apresentaram diferença significativa entre as amostras 0,8% e 1,6% e diferiram significativamente entre as amostras, 0,8% e 2,4% e 1,6% e 2,4%. O teor de cálcio foi superior nas partículas processadas na concentração 2,4%, cerca de 162,0 mg/L, seguido pelas partículas processadas em cloreto de cálcio 1,6%, 142,7 mg/L e partículas processadas em cloreto de cálcio 0,8% com 137,3 mg/L, evidenciando que o aumento da concentração de cloreto de cálcio na solução aumentou o teor de cálcio presente nas partículas, comportamento

não observado nos valores de potencial Zeta obtidos para as partículas de gelificação iônica em função do aumento da quantidade de cálcio em solução.

Os resultados descritos podem ser justificados pelo número de ligações dos grupos carboxilas do alginato com íons cálcio em cada uma das concentrações de cloreto de cálcio utilizadas. Segundo Moe et al. (1995) a quantidade de cálcio em partículas de alginato pode ser explicado pela presença de resíduos sequenciais longos de blocos G presentes na sua molécula, que permite conduzir à reticulação com mais eficiência. Estudos demonstram a importância dos blocos G para a formação das zonas de junção em géis de alginato (BRACCINI et al. 1999), principalmente quando o cálcio é utilizado para reticulação iônica (MORCH et al., 2006).

Devido à alta solubilidade do cloreto de cálcio em solução aquosa, ao serem pulverizadas, as gotas do polissacarídeo tem sua camada externa imediatamente formada pela interação dos íons cálcio e grupos carboxílicos da cadeia polimérica, enquanto a complexação interna da gota será dependente do processo de difusão de íons cálcio (CHAI et al., 2004). De acordo com McLoughlin (1994) as partículas produzidas com alginato de sódio podem não ser homogêneas, apresentando em sua interface uma maior concentração polímero-cálcio que decresce à medida que se avança ao centro do gel.

Segundo Zimmermann (2001) quanto maior a concentração da solução de cloreto de cálcio ocorre uma maior compactação da superfície do gel, diminuindo a porosidade e a velocidade de formação do gel no centro da partícula. Além disso, o período de contato das micropartículas na solução gelificante influencia diretamente na rigidez da partícula, devido ao aumento da espessura da parede e conseqüentemente a resistência à ruptura mecânica, sendo necessários em torno de 20 minutos em banho iônico sob agitação para que as micropartículas atinjam sua estabilidade

O ajuste das concentrações de íons Ca^{2+} e do polissacarídeo aniônico utilizado para a produção das partículas pode ser determinado através da construção de diagramas de fase (concentração do íon x concentração do polissacarídeo). O diagrama apresenta três regiões, a região onde ocorre a formação de um gel e uma terceira região denominada região de sinérese, onde o gel é formado rapidamente, porém ocorre expulsão intensa de água da matriz gelificada.

Segundo Mestdag e Axelos (1998) os géis obtidos em duas diferentes combinações do polissacarídeo e do íon cálcio irão apresentar características de dureza, porosidade e liberação controlada diferenciada. Embora os valores do potencial Zeta das partículas (Tabela 3) sejam muito inferiores aos valores do potencial Zeta da solução de alginato (Tabela 2) como esperado, a Tabela 3 mostra que não existe uma variação proporcional nos valores do potencial Zeta quando a concentração de cálcio variou de 0,8 para 1,6 e para 2,4%. É possível que a escolha desta faixa de variação na concentração do íon cálcio tenha sido muito pequena para produzir uma variação proporcional nos valores dos potenciais Zeta medidos nas partículas de gelificação iônica.

Cabe ressaltar que os estudos preliminares buscaram escolher concentrações do íon cálcio suficientes para produzir partículas esféricas acompanhadas por observações morfológicas, mantidas as outras variáveis constantes. Estequiometricamente, 7,2% de íons cálcio são requeridos, baseado na massa de alginato de sódio, para a completa substituição do sódio, no entanto géis são formados com valores ao redor de 30% desta quantidade (KELCO, 1987). Em geral, a maioria dos artigos publicados na literatura trabalha com concentrações de íons cálcio entre 1 a 5% e de alginato entre 1 a 3%. Entretanto concentrações muito mais altas foram utilizadas para a produção de partículas por gelificação iônica, 0,5 - 1,0% de alginato e 10% de Ca^{2+} (ZHANG et al., 2016).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE ALGINATO RECOBERTAS COM CPS

5.5.1 Composição proximal das micropartículas

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados das determinações de proteína adsorvida sobre as partículas, o teor de umidade e cinzas após o recobrimento proteico nos pHs 3,5 e 7,0.

Os teores de umidade obtidos foram semelhantes em todos os tratamentos, variando de 95% a 96% sem diferença significativa entre as amostras. O elevado

conteúdo de água presente nas micropartículas pode ser justificado devido ao polissacarídeo apresentar alta capacidade de retenção de água e ser estruturado em redes tridimensionais hidrofílicas (LIU et al., 2007). As partículas produzidas apresentaram baixos teores de cinzas variando de 0,26 a 0,49% em pH 7,0 e de 0,38 a 0,41% em pH 3,5.

Tabela 6 - Teores de umidade, proteína e cinzas das micropartículas em diferentes concentrações de cloreto de cálcio (%) e pH.

pH	CaCl ₂ (%)	Proteína (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)
7,0	0,8	1,9±0,17 ^{a*}	96±0,9 ^a	0,49±0,0 ^b
7,0	1,6	1,8±0,05 ^a	96±0,3 ^a	0,29±0,0 ^a
7,0	2,4	1,8±0,05 ^a	95±0,8 ^a	0,26±0,1 ^a
3,5	0,8	6,60±0,1 ^{A**}	95±0,3 ^B	0,41±0,1 ^C
3,5	1,6	6,54±0,15 ^A	95±0,5 ^B	0,57±0,2 ^C
3,5	2,4	6,70±0,28 ^A	95±0,3 ^B	0,38±0,1 ^C

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias obtidas através do teste Tukey ($p < 0,05$) para as partículas em pH 7,0.

**Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias obtidas através do teste Tukey ($p < 0,05$) para as partículas em pH 3,5.

Fonte: Dados da pesquisa

Em relação à quantidade de cálcio nas partículas (Tabela 5), a quantidade de proteína adsorvida sobre as partículas em cada um dos pHs estudados, apresenta-se praticamente constante, independente das diferentes concentrações de cálcio utilizadas em solução, embora a quantidade de cálcio presente nas partículas aumentou conforme aumentou a quantidade de cálcio em solução durante a produção.

A quantidade de proteína adsorvida nas partículas em função dos diferentes valores de pH estudados (Tabela 6) foi muito diferente nos dois pHs estudados, com quantidade proteica adsorvida no pH 3,5 ao redor de 3,5 vezes superior às obtidas no pH 7. Os resultados mostraram claramente que o pH do meio foi fundamental na maior adsorção proteica no pH 3,5, onde a proteína apresenta-se carregada positivamente e a partícula de alginato carregada negativamente, favorecendo fortemente a adsorção por interação eletrostática entre a partícula e a proteína.

A adsorção de proteína é um fenômeno que envolve as propriedades químicas da molécula de proteína e diferentes forças de sua superfície, incluindo as forças de van der Waals e ligações de hidrogênio e principalmente as interações

eletrostáticas e hidrofóbicas (ROACH et al., 2005). Os resultados indicam que a interação eletrostática foi o fator mais importante no total de proteínas adsorvidas para a condição de cargas opostas apresentada no pH 3,5. O potencial Zeta das soluções de biopolímeros (Tabela 2) bem como o potencial Zeta das micropartículas sem recobrimento (Tabela 3) justificam os resultados obtidos no pH 3,5.

A Tabela 6 mostra que mesmo em condição de cargas de mesmo sinal, e negativas, para a solução proteica e para as partículas de gelificação iônica, uma adsorção proteica ao redor de 2% em massa foi observada no pH 7. Ortiz et al. (2004) estudaram interações e funcionalidade entre IPS e carragena e observaram que complexos entre a proteína e o polissacarídeo foram formados em valores de pH altos e baixos. De acordo com os autores, interações hidrofóbicas foram dominantes na formação de complexos em pH altos enquanto interações eletrostáticas dominaram as interações e formação de complexos em valores de pH baixos. Ainda segundo os autores, associações em valores altos de pH, em que os biopolímeros apresentam ambas cargas negativas, podem ter ocorrido por interação eletrostática entre fragmentos positivos apresentados pela proteína mesmo em pHs acima de seu ponto isoelétrico.

Associações eletrostáticas proteína-polissacarídeo acima do ponto isoelétrico da proteína, devido à presença de *patches* carregados positivamente na proteína foram considerados anteriormente (KAYTMAZER et al., 2013).

Valores mais altos de adsorção proteica foram obtidos para proteínas animais globulares, que em condições similares de concentração de proteínas em solução, resultaram em adsorções proteicas de ~ 15%, ~ 16% e ~ 20% de proteínas peso/peso de partículas em base seca, quando ovoalbumina, ovoalbumina:proteína de soro de leite (1:1) e proteína de soro de leite foram utilizadas em solução contendo 2% de proteína, com partículas produzidas com 2% de solução de alginato e 2% de solução de cálcio e adsorção feita em pH 4,0 (TELLO, 2015).

5.5.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas com e sem recobrimento proteico

Os tamanhos médios das micropartículas de alginato com e sem recobrimento proteicos, bem como a avaliação de diferenças entre médias, estão apresentados na Tabela 7. A avaliação dos resultados necessita ser feita de forma cuidadosa uma vez que os desvios padrão obtidos são altos em todas as medidas efetuadas, decorrentes do tipo de atomizador utilizado (duplo fluido).

As condições de atomização podem influenciar diretamente no tamanho médio das partículas. Moya et al. (2012), ao avaliar a estabilidade de micropartículas de alginato *in vitro*, verificou que fatores como a composição do alginato e o diâmetro da agulha utilizada para sua produção afetaram o tamanho médio das partículas. Na técnica de gelificação iônica muitos parâmetros podem interferir no tamanho médio das partículas de polissacarídeos, como a concentração e estrutura dos polissacarídeos, o diâmetro da agulha do atomizador e a distância da agulha ao nível da solução de cloreto de cálcio (SMRDEL et al., 2008).

O uso do atomizador duplo fluido permite diminuir o tamanho médio das partículas obtidas por gelificação iônica em comparação à formatação de partículas utilizando seringas e agulhas de diâmetros variados, porém, por seu desenho, o atomizador apresenta uma alta polidispersidade de tamanho na formação das gotas e conseqüentemente no tamanho médio das partículas formadas, evidenciada pelos altos desvios padrão obtidos nas amostras (Tabela 7).

Tabela 7 - Tamanho médio das micropartículas com e sem recobrimento proteico.

Amostras	Partícula sem recobrimento (μm)	*CPS pH 3,5 (μm)	**CPS pH 7,0 (μm)
0,8%	154,73 \pm 63,37 ^{bA}	258,25 \pm 82,92 ^{aB}	197,37 \pm 107,53 ^{aA}
1,6%	205,12 \pm 86,06 ^{aA}	234,57 \pm 62,26 ^{aA}	258,38 \pm 70,43 ^{bA}
2,4%	204,81 \pm 41,06 ^{aA}	334,65 \pm 23,15 ^{bB}	239,99 \pm 33,39 ^{abC}

*Partículas de alginato recobertas com concentrado proteico de soja (CPS) no pH 3,5

**Partículas de alginato recobertas com concentrado proteico de soja (CPS) no pH 7.0

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre as médias obtidas através do teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa

Na Tabela 7 o diâmetro médio obtido nas partículas sem recobrimento quando 0,8% de cálcio ($154,7 \pm 63,4 \mu\text{m}$) foi utilizado, diferiu significativamente dos diâmetros médios em 1,6% de cálcio ($205,1 \pm 41,1 \mu\text{m}$) e 2,4% de cálcio ($204,8 \pm 86,1 \mu\text{m}$), indicando um aumento de tamanho médio com o aumento da quantidade de cálcio presente nas partículas.

Peretz et al. (2015) produziram partículas por gelificação iônica utilizando combinações de alginato de sódio, 3% e cloreto de cálcio, 1%, 5% e 10%, obtendo diâmetros médios das partículas crescentes com o aumento das concentrações de cálcio em solução usadas para a produção das partículas.

Os aumentos da concentração de cálcio, o agente de *cross-linking* para a produção de partículas por gelificação iônica, buscam mais que alterar o tamanho da partícula, mas também alterar a porosidade do gel, aumentando a densidade de intercruzamentos, observando-se que aumento na quantidade de cálcio diminui a porosidade das partículas e altera a morfologia de superfície das partículas, características que podem alterar o inchamento das partículas e regular melhor a liberação de agentes ativos encapsulados (PATHAK et al., 2010).

De acordo com Smilkov et al. (2014), ao avaliarem o efeito da concentração de alginato, concentração de cálcio e concentração de proteína de soro de leite na encapsulação de uma bactéria probiótica, observaram que a concentração de proteína de soro teve maior efeito sobre o tamanho da partícula enquanto a concentração de cálcio apresentou menor efeito sobre o tamanho médio.

Independente da concentração de cálcio e do pH utilizados para a produção das partículas, é possível observar que o recobrimento proteico produziu aumento no diâmetro médio das partículas recobertas em relação ao diâmetro médio das partículas produzidas por gelificação iônica sem recobrimento (Tabela 7).

A amostra 2,4% revestida com CPS pH 3,5 apresentou partículas com maior diâmetro médio comparada as demais, $334,6 \pm 23,1 \mu\text{m}$. Maior adsorção proteica produziu maior diâmetro médio de partícula, exceto quando 1,6% de cálcio foi utilizado e maior tamanho foi obtido para a condição de pH 7,0.

Alguns autores relataram tamanhos médios aproximados aos encontrados neste estudo para outras combinações de biopolímeros. Micropartículas de alginato-pectina produzidas por gelificação iônica em pH 3,5 apresentaram $261 \pm 19 \mu\text{m}$ e as micropartículas revestidas com proteína do ovo mediram $287 \pm 10 \mu\text{m}$. Em pH 3,75, as partículas de gelificação iônica não revestidas mediram $259 \pm 22 \mu\text{m}$ enquanto

partículas revestidas com proteínas de soro de leite apresentaram tamanho médio de $283 \pm 6 \mu\text{m}$ (AGUILAR et al., 2015). Tello et al. (2015) produziram partículas de alginato e pectina revestidas com proteínas da clara de ovo (OVA), do soro do leite (WPC) e da mistura de ambas. As amostras revestidas com OVA, OVA:WPC e WPC mediram $173 \pm 7 \mu\text{m}$, $174 \pm 5 \mu\text{m}$ e $166 \pm 6 \mu\text{m}$, respectivamente. Partículas produzidas com pectina e submetidas à adsorção com OVA, OVA:WPC e WPC mediram $193 \pm 12 \mu\text{m}$, 189 ± 9 e $181 \pm 8 \mu\text{m}$ respectivamente. Os autores observaram que após a adsorção de proteínas as partículas de alginato aumentaram seu tamanho médio, assim como pode ser verificado neste estudo.

A Tabela 8 apresenta o índice de polidispersão (Span) obtidos a partir da distribuição de tamanho utilizada para a determinação de tamanho médio de cada amostra. O índice Span refere à amplitude da distribuição de tamanho das micropartículas, onde quanto menor o valor de Span, mais estreita e homogênea será a distribuição de tamanho (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007).

Tabela 8 - Polidispersidade (SPAN) das micropartículas com e sem revestimento proteico.

CaCl ₂ (%)	S/ Revestimento	pH 3,5*	pH 7,0**
0,8	1,85±0,04 ^{ab}	1,82±0,08 ^{ab}	1,72±0,13 ^{aA}
1,6	2,07±0,56 ^{aA}	2,16±0,39 ^{bA}	2,16±0,13 ^{bA}
2,4	1,67±0,07 ^{aA}	1,86±0,07 ^{abB}	1,78±0,13 ^{abAB}

*Partículas de alginato recobertas com concentrado proteico de soja (CPS) no pH 3,5

**Partículas de alginato recobertas com concentrado proteico de soja (CPS) no pH 7.0

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre as médias obtidas através do teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa

Os valores encontrados mostraram uma larga distribuição de tamanho entre as amostras, quer variam de 1,67 a 2,07 das cápsulas sem revestimento, 1,82 a 2,16 e 1,72 a 2,16 das partículas com adsorção proteica em pH 3,5 e 7,0 respectivamente. Os índices de polidispersão apresentados são semelhantes aos encontrados por Galindo et al. (2016) ao produzir micropartículas de quitosana com óleo de palma por gelificação iônica, obtendo elevados valores de span (1,24 a 1,93).

Com relação ao Span as micropartículas sem revestimento proteico não apresentaram diferença significativa nas concentrações de cloreto de cálcio

estudadas. Já as partículas com recobrimento proteico nos pHs 3,5 e 7,0 diferiram significativamente nas concentrações 0,8% e 1,6%.

Ao analisar as micropartículas com e sem recobrimento proteico nas concentrações de 0,8%, 1,6% e 2,4% de cloreto de cálcio verifica-se um pequeno aumento no valor do Span nas partículas a 1,6%, porém sem diferença significativa.

Os índices de span elevados indicam que não houve homogeneidade quanto ao tamanho das amostras que também podem ser observadas através da morfologias das partículas (figuras 6, 7 e 8) corroborando os valores do índice de polidispersão, as imagens mostram partículas maiores, outras de tamanho reduzido e algumas aglomeradas.

Os gráficos de distribuição de tamanho das partículas com e sem recobrimento proteico estão apresentados nos anexos 1 a 9, onde é possível verificar a ampla polidispersidade das partículas. Nogueira (2013) ao produzir micropartículas com multicamadas com alginato e soro de leite obteve uma relativa homogeneidade de distribuição de tamanho da maioria das partículas.

Segundo Bajpai e Tankhiwale (2008), a uniformidade no tamanho das microcapsulas é possível desde que sejam mantidos constantes alguns parâmetros de produção, tais como a, distância entre bico atomizador e a solução iônica, a queda das gotas sob a agitação ou a viscosidade da solução. Variação mínima em qualquer um destes parâmetros poderá resultar em uma produção de partículas com tamanho não homogêneo.

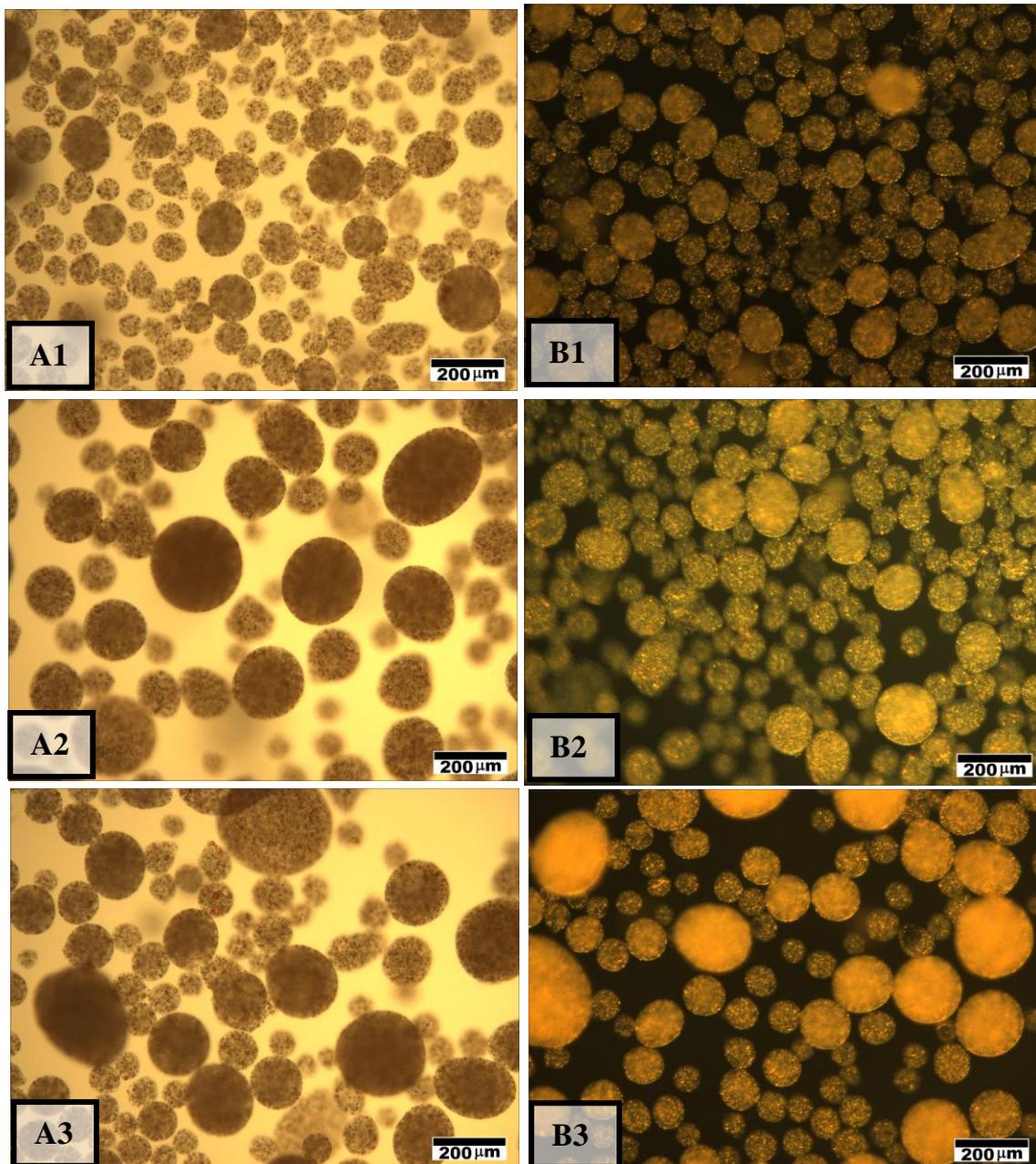
5.5.3 Morfologia das partículas úmidas de alginato com e sem recobrimento proteico

A morfologia das micropartículas pode ser visualizada nas Figuras 6, 7 e 8. As imagens mostram que micropartículas obtidas nos diferentes tratamentos apresentaram-se morfologicamente semelhantes, com forma esférica ou oval. O interior da partícula tem característica multinucleada e com material lipídico homogeneamente distribuído por toda a extensão da partícula.

Microcápsulas produzidas com biopolímeros em sua maioria irão se apresentar em forma esférica, mas também podem obter formato de fibras, aglomerados ou esferóides. Além de analisar a estrutura externa das partículas a

avaliação de seu interior é de suma importância, já que poderá influenciar em características funcionais como a permeabilidade, integridade, eficiência de encapsulação, e digestibilidade da partícula (JONES; MCCLEMENTS, 2010). Franzesi et al. (2006) observaram que a distribuição do ativo na matriz e a forma da partícula influenciaram a cinética de liberação do fármaco encapsulado.

Figura 6 - Microscopia óptica das micropartículas sem revestimento proteico com fonte de luz convencional (A) e fonte de luz de fibra ótica (B), 1) Partículas 0,8% CaCl_2 ; 2) Partículas 1,6% CaCl_2 ; 3) Partículas 2,4% CaCl_2 .

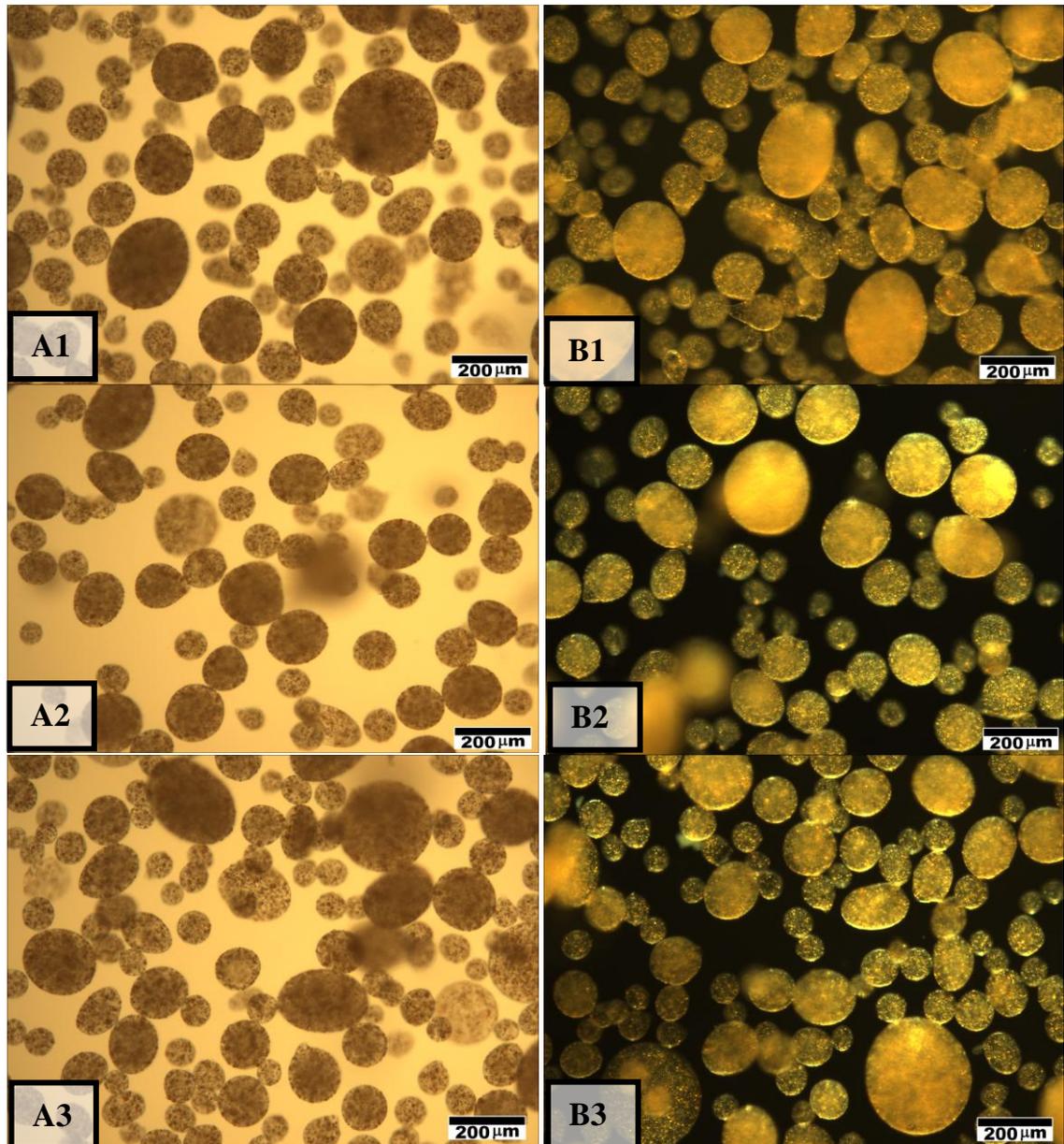


Fonte: Autoria própria

Em relação às concentrações de cloreto de cálcio testadas, a morfologia das partículas não apresentou alterações. Nas figuras 7 e 8 podem ser visualizadas as partículas submetidas à adsorção proteica nos pHs 3,5 e 7,0 . A mudança no pH ou a aderência da camada proteica também não afetaram as características morfológicas das partículas que não apresentam diferenças entre si. Nota-se que o processo de interação eletrostática não modificou a esfericidade característica da partícula.

Segundo McClements (2005) é possível que as interações dos biopolímeros sejam responsáveis por causar transformações morfológicas nas partículas, como inchamento, integridade, corrosão e até mesmo sua desintegração.

Figura 7 - Microscopia óptica das micropartículas com revestimento proteico no pH 3,5 com fonte de luz convencional (A) e fonte de luz de fibra ótica (B), 1) Partículas 0,8% CaCl₂; 2) Partículas 1,6% CaCl₂; 3) Partículas 2,4% CaCl₂

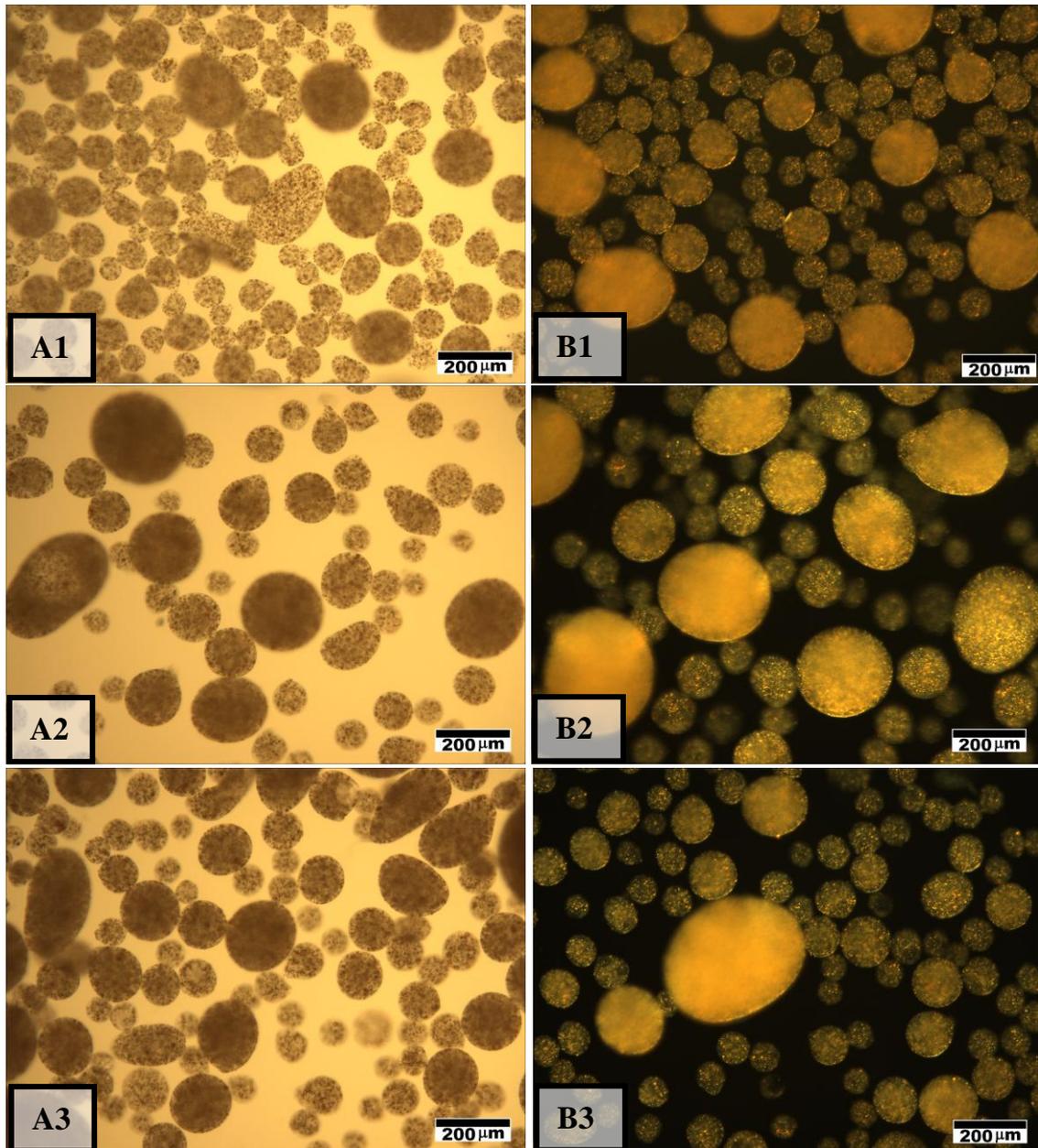


Fonte: Autoria própria

Alterações na morfologia da partícula podem ocorrer em função da força e da intensidade da interação eletrostática entre as soluções de bipolímeros, afetando o inchamento das partículas (JONES; McCLEMENTS, 2010). Neste estudo as partículas mantiveram-se íntegras em todos os ensaios assim como a superfície se manteve lisa mesmo após incorporação da camada proteica de soja.

Os resultados obtidos através da microscopia óptica são semelhantes ao relatado por Doherty et al. (2012) que ao produzirem microcápsulas de alginato e posterior deposição eletrostática de uma camada de proteína de soro de leite obtiveram partículas com superfície contínua visualmente lisa.

Figura 8 - Microscopia óptica das micropartículas com revestimento proteico em pH 7,0 com fonte de luz convencional (A) e fonte de luz de fibra ótica (B) 1) Partículas 0,8% CaCl₂; 2) Partículas 1,6% CaCl₂; 3) Partículas 2,4% CaCl₂.



Fonte: Autoria própria

Em estudo de produção micropartículas com multicamadas obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática, Nogueira (2013) observou que o método não alterou a esfericidade característica da partícula, porém afetou sua estrutura que se mostrou aumentada, fragilizada, inchada e hidratada, dependendo do número de camadas adsorvidas, intercalando adsorção de proteína de soro de

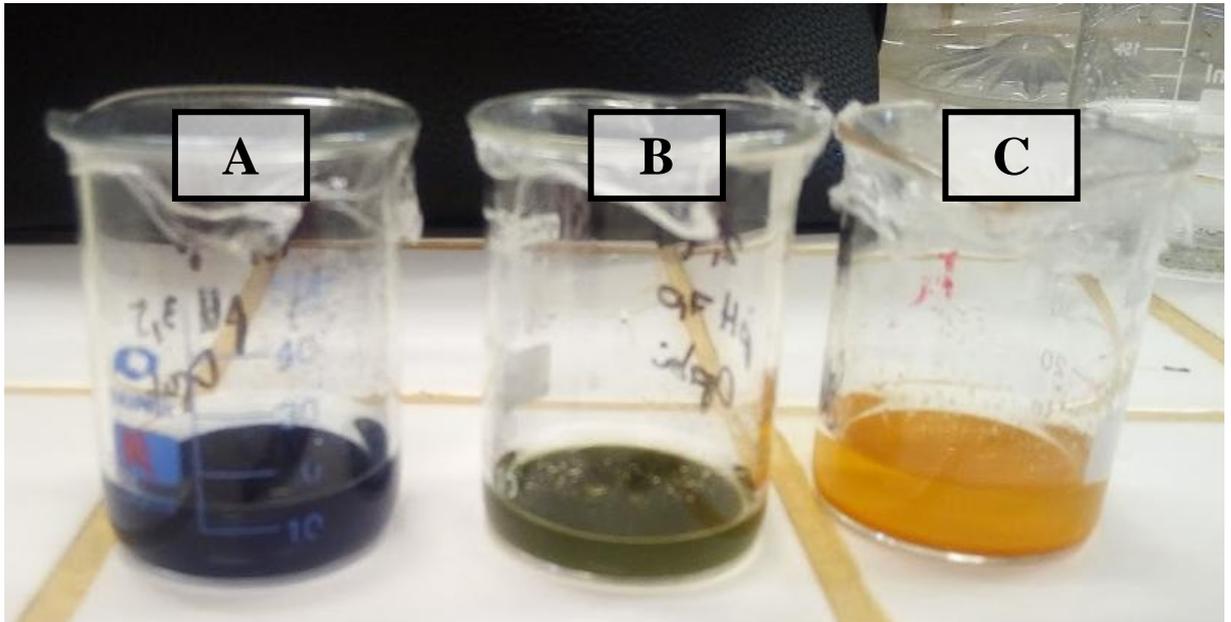
leite, posteriormente nova camada de alginato e finalmente uma terceira camada de proteína de soro de leite. O autor observou um aumento considerável do diâmetro, embora as partículas continuassem esféricas, após a adsorção da camada de alginato, justificada pela hidrofiliçidade alta do polissacarídeo e grande retenção de água. O autor ainda observaram uma diminuição do diâmetro após o novo recobrimento com proteína de soro de leite na terceira camada de recobrimento.

5.5.4 Avaliação qualitativa morfológica da adsorção proteica com o Coomassie Blue

A adsorção de proteína sobre as micropartículas de gelificação iônica foi avaliada qualitativamente (Figura 9). As microcápsulas revestidas com CPS em pH 7,0 e coradas com o Coomassie Blue, que é um corante específico para proteína, apresentaram coloração esverdeada provocada pela interação da cor laranja da óleosina com a menor quantidade de cor azul, dada a baixa quantidade de proteína adsorvida, enquanto as partículas recobertas com CPS em pH 3,5 e coradas com o Coomassie Blue, apresentaram coloração azul intensa devido a mais alta quantidade de cor azul proveniente da maior quantidade de proteína adsorvida nesta condição.

Os resultados observados indicam uma maior concentração de proteína nas partículas tratadas em pH 3,5 devido a maior fixação das proteínas com o corante. O teor de proteínas nas partículas (Tabela 6) corrobora os resultados apresentados. As microcápsulas sem recobrimento proteico, quando tratadas com o descolorante, retornaram a coloração original, mantendo-se laranjas e indicando a ausência de proteínas nas partículas.

Figura 9 - Béqueres com micropartículas coradas com Coomanssie Blue, após aplicação do descolorante. A) Partículas com CPS pH 3,5; B) Partículas com CPS pH 7,0; C) Partículas sem adsorção proteica.

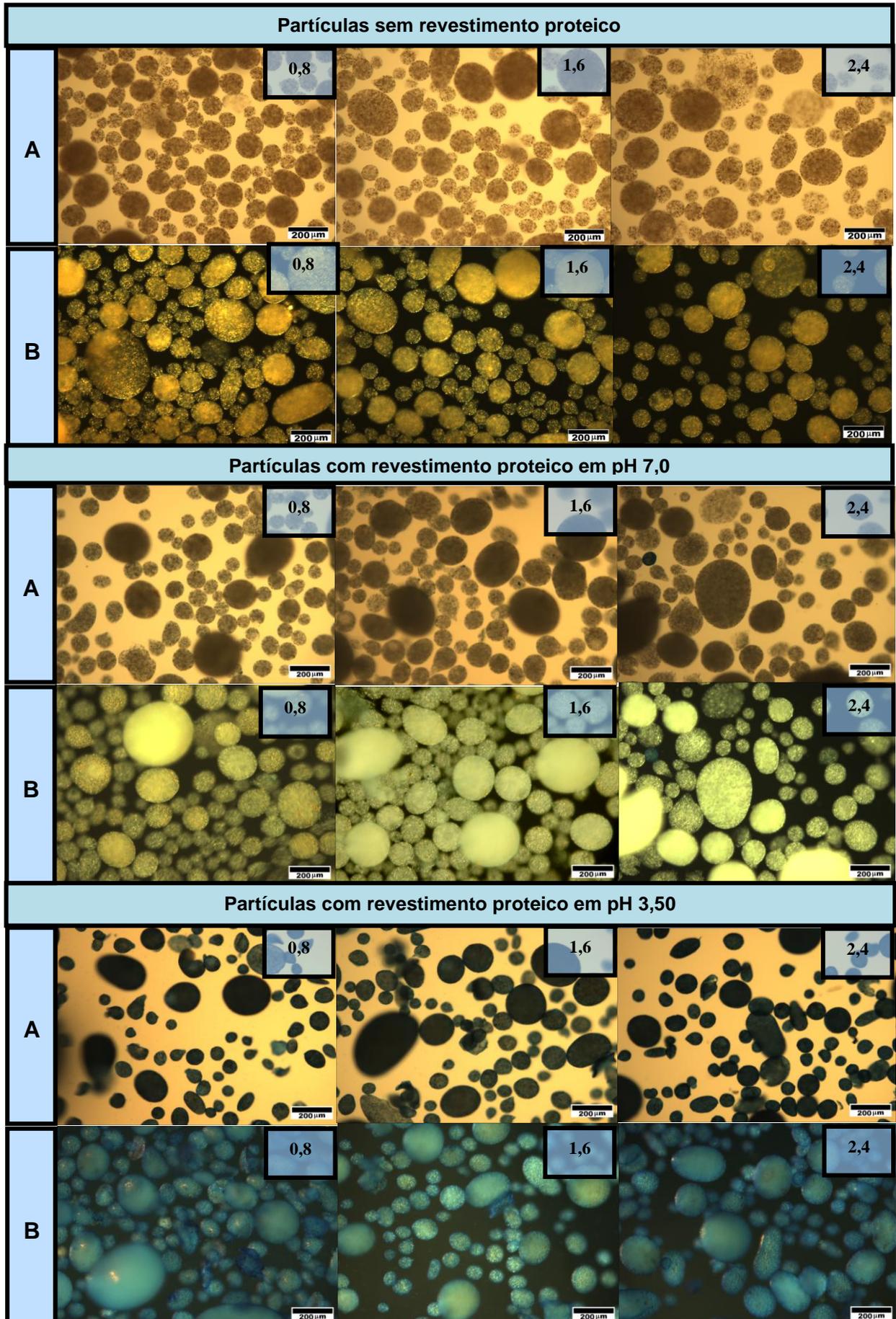


Fonte: Autoria própria

Na Figura 10, onde todas as partículas foram coloridas com Coomanssie e posteriormente descoloridas, podem ser observadas por microscopia ótica as micropartículas com fonte de luz convencional e fonte de luz de fibra ótica. A microscopia das partículas com revestimento proteico em pH 3,5, em ambos os tratamento de luz aplicados, apresentam partículas de intensa coloração azul independente da concentração de cloreto de cálcio utilizado.

Comparando-se as partículas com CPS em pH 7,0 com as tratadas em pH 3,5 observa-se uma perda na coloração azul, apresentando partículas amarelo-esverdeadas em todas as concentrações de cloreto de cálcio estudadas, que são facilmente visualizadas nas imagens obtidas por fonte de luz de fibra ótica (B).

Figura 10 - Microscopia óptica das micropartículas com revestimento proteico nos pHs 3,5 e 7,0 coradas com Coomanssie Blue. Imagens obtidas com fonte de luz convencional (A) e fonte de luz de fibra ótica (B).



Fonte: Autoria própria

As fontes de luz utilizadas na microscopia influenciaram na aparência visual das partículas. Nas partículas com revestimento proteico em pH 3,5 as imagens obtidas com fonte de luz convencional (A) apresentaram microcápsulas de cor azul mais escura comparada às imagens obtidas com fonte de luz de fibra ótica (B). O mesmo comportamento pode ser verificado nas partículas com revestimento proteico em pH 7,0, que com fonte de luz convencional apresentaram microcápsulas mais escuras enquanto, que com fonte de luz de fibra ótica obteve-se partículas amarelo-esverdeadas, refletindo melhor o resultado avaliado na Figura 9.

A microscopia com a fonte de luz de fibra ótica destacou-se por ser uma técnica simples, em que não há a necessidade do preparo da amostra além de não deformar a partícula pelo processo de secagem, mantendo suas características morfológicas. As micropartículas obtidas por este método apresentaram efeito tridimensional de profundidade.

Os resultados obtidos com a avaliação morfológica das partículas são semelhantes ao apresentado por Beraldo (2016) ao analisar micropartículas de alginato de sódio revestidas com gelatina e hidrolisados de gelatina/ colágeno com diferentes graus de hidrólise. O Autor seccionou as partículas e, posteriormente, as laminas microtomadas contendo as partículas foram coradas com Coomassie Blue e visualizadas em microscópio ótico, apresentando um halo azul no perímetro das partículas, mostrando que a adsorção proteica foi mais intensa na parte mais externa das partículas obtidas por gelificação iônica com posterior adsorção proteica.

6 CONCLUSÃO

As micropartículas de alginato com revestimento proteico de CPS em pH 3,5 obtiveram maior adsorção proteica, situação em que as partículas e a solução proteica apresentam cargas opostas, acima do pKa do polissacarídeo e abaixo do ponto isoelétrico do CPS. Este efeito foi drasticamente minimizado quando o pH de adsorção foi de 7,0, situação onde as partículas e a solução de CPS apresentam cargas negativas impossibilitando a interação eletrostática como principal mecanismo para a adsorção proteica, que pode ter ocorrido devido a interações hidrofóbicas. A avaliação qualitativa morfológica corroborou para maior adsorção proteica em pH 3,5. O aumento da concentração de íons cálcio (0,8; 1,6 e 2,4%) durante a gelificação iônica não apresentou efeito sobre a adsorção proteica nos dois valores de pH avaliados.

O revestimento proteico provocou um aumento no tamanho médio das partículas nos dois valores de pH estudados, mas estas apresentaram-se morfológicamente esféricas, com o material de recheio distribuído de forma multinuclear e paredes contínuas e visualmente lisas. Além disso a técnica de microscopia com a fonte de luz de fibra ótica conferiu as microscopias das partículas efeito tridimensional de profundidade, mostrando-se inovadora com resultados melhores que a microscopia ótica convencional

7 SUGESTÕES PARA NOVOS TRABALHOS

A tecnologia de microencapsulação tem se expandido e revelado um crescente potencial de aplicação na indústria de alimentos, diante disso outros estudos devem ser conduzidos para avaliar outros aspectos, como a resistência térmica das partículas recobertas, sua estabilidade em diferentes concentração de NaCl e o comportamento das partículas de alginato recobertas com proteína submetidas a condições gastrointestinais *in vitro* na liberação de compostos ativos em locais específicos do trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, K. C. et. al. Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, v.154, p.17–24, 2015.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 240-251, 2007.

ANAL, A. K.; STEVENS, W. F. Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 45–54, 2005.

AOAC. **Association of official analytical chemist's official methods of analysis**. 16th Ed. Washington, 2006.

BAJPAI S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: part A. **Reactive and Functional Polymer** , v. 66, p. 645-658, 2006.

BAJPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Preparation, characterization and preliminary calcium release study of floating sodium alginate/dextran-based hydrogel beads: part I. **Polymer International**, v. 57, p. 57- 65, 2008.

BARANAUSKIENÉ, R. et al. Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3037-3036, 2007.

BELLAVER, C.; SNIZEK JR, P. N. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais eletrônico**, Londrina: Embrapa Soja, PR, 1999. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_x5k97v3r.pdf> Acesso em: 29 de jul. 2018.

BERALDO, J. C. **Produção de micropartículas de alginato tendo como cobertura gelatina e colágeno com diferentes graus de hidrólise**. 2016. 114 f Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19–34, 2004.

BERTOL, T.M. et al. Proteínas da soja processadas de diferentes modos em dietas para desmame de leitões. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v.30, n.1, p.150- 157, 2001.

BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88, n.6, p.686-689, 1999.

BRACCINI, I.; GRASSO, R. P.; PÉREZ, S. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation, **Carbohydrate Research**, v. 317, p. 119-130, 1999.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca²⁺ Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited, **Biomacromolecules**, v.2, p.1089-1096, 2001.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos proteicos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2005.

BUREY, P. et al. Hydrocolloids gel particles: Formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 361-377, 2008.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467–483, 2011.

CHAI, Y. et al. Gelation conditions and transport properties of hollow calcium alginate capsules. **Biotechnology Bioengineering**, v. 87, p. 228–233, 2004.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 184-190, 2007.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. **Carbohydr. Polym**, v.63, p.176–187, 2006.

CHANDRAMOULI, V. et al. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Jour. of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27– 35, 2004.

CHÁVARRI, M. et al. C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **Inter. J. of Food Microbiology**, v.142, p.185–189, 2010.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. p. 346.

COSTA, B. S. **Micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja**. 119 f. 2014. Dissertação (Mestrado Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

CROGUENNOG, P. et al. Phase Separation and Association of Globular Protein Aggregates in the Presence of Polysaccharides: 1. Mixtures of Preheated β -Lactoglobulin and κ -Carrageenan at Room Temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 14, p. 4372-4379, 2001a.

CROGUENNOG, P. et al. Phase Separation and Association of Globular Protein Aggregates in the Presence of Polysaccharides: 2. Heated Mixtures of Native β -Lactoglobulin and κ -Carrageenan. **Langmuir**, v. 17, n. 14, p. 4380-4385, 2001b.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre, Artmed. p. 179-262. , 2010.

DEAK, N.A. et al. Soy protein products, processing and utilization. In: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: chemistry, production, processing and utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008. p. 661-724.

DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 340-349, 2004.

DE VOS, P. et al. Zeta-potentials of alginate-PLL capsules: a predictive measure for biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research**, Part A, v. 80, p. 813-819, 2007.

DESAI, K.G.H; PARK, H.J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Tecnology**, v.23, n.7, p.1361-1394, 2005.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

DOHERTY, S. B. et al. Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, p. 713-728, 2012.

DOHERTY, S.B. et al. Development and characterization of whey protein microbeads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1604-1617, 2011.

DOUMÈCHE, B. et al. New approaches to the visualization, quantification and explanation of acid-induced water loss from Ca alginate hydrogel beads. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 5, p. 565–573, 2004.

EMBRAPA, **Soja em números (safra 2016/2017)**. 2017. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 26 de março. 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production, proerties and uses of alginates**. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/X5822E/x5822e04.htm>>. Acesso em: 26 de fev. 2018.

FARRIS, S. et al. Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio based polymers for food packaging applications: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 316-332, 2009.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. ed Marcel Dekker Inc, New York, 1996.

FRANZESI, T. G. et al. A Controlled-Release Strategy for the Generation of Cross-Linked Hydrogel Microstructures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 47, p. 15064-15065, 2006.

FUJIWARA, G. et al. Comparação entre os perfis de liberação de azul de metileno a partir de micropartículas de alginato-quitosana em pH ácido. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, 2010.

GALINDO, M. V. et al. Produção de micropartículas de quitosana com óleo de palma. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos:Alimentação a árvore que sustenta a vida, **Anais eletrônico**, Gramado, 2016. Disponível :< <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/1013.pdf>> Acesso em: 10 de jun. 2018.

GEBARA, C. et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 872-878, 2013.

GIBBS, B. F. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213-224, 1999.

GIRARD, M. et al. Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 35, p. 15-22, 2004.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Interbiopolymer complexing between [β]-lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 6, p. 585-591, 2002.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.31, p.267–285, 1998.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, p.330-347, 2004.

HIRSH, S. L. et al. The Vroman effect: competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 395-404, 2013.

HUA, Y. et al. Properties of soy protein isolate prepared from aqueous alcohol washed soy flakes. **Food Research International**, v. 38, p. 273-279, 2005.

JAFARI, S. M. et al. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. **Drying Technology**, p. 816-835, 2008.

JIZOMOTO, H. et al. Gelatin Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready desintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 1115-1122, 1993.

JONES, O.G.; McCLEMENTS, D.J. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.374-397, 2010.

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. **Food Chemistry**, v.125, p. 1267–1272, 2011.

KAZMIERSKI, M.; WICKER, L.; CORREDIG, M. Interactions of β -lactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, 2003, p. 1673-1679.

KAYTMAZER, A. B. et al. Protein-polyelectrolyte interactions, **Soft Matter**, v. 9, p. 2553-2583, 2013.

KEERATI-U-RAI, M.; CORREDIG, M. Heat-Induced changes occurring in oil/water emulsions stabilized by soy glycinin and β -conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9171-9180, 2010.

KELCO. **Alginate products for scientific water control**, 3rd ed., San Diego- Ca, p. 41, 1987.

KHEIREDDIN, B., ZHANG, M., AKBULUT, M. Adhesion friction and lubrication of polymeric nanoparticles and their application. In: ZENG, H. **Polymer adhesion friction and lubrication**, New York, p. 617-657, 2013.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenol phytochemicals, **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 213-218, 1999.

KINSELLA J. E.; SOUCIE W. G.; **Food Proteins**, AOCS: New York, 1989.

KINSELLA, J.E.; DAMODARAN, S.; GERMAN, A.B . Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. In: ALTSCHUL, A.M.; WILCKE, H.L. (Ed) **New Protein Foods**, 2.ed. Orlando: Academic Press, v. 5, 1985. p. 107-79.

KRASAEKOOPT, W.;BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for youghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.

KUMAR, R. et al. Adhesives and plastics based on soy protein produts. *Industrial Crops and Products – an International Journal*, Arizona, v. 16, n. 3, p. 155-172, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structured proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, K. H.; RYU, H. S.; RHEE, K. C. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 80, n. 1, p. 85-90, 2003.

LI, X. Y. et al. Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate–gelatin and its properties. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n.4, p.315–324, 2009.

LIU, L.; FISHMAN, M.; HICKS, K. Pectin in controlled drug delivery – a review. **Cellulose**, v. 14, n. 1, p. 15-24, 2007.

LUSAS, E.W.; RIAZ, M.N. Soy protein products: processing and use. **Journal of Nutrition**, v.125, p.573S - 580S, 1995.

MAESTRELLI, F. et al. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 508-518, 2008.

MARTINEZ, A. P. C. et al. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, p. 23 30, 2011.

McCLEMENTS, D. J. Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. **Langmuir**, v. 21, p. 9777-9785, 2005.

McCLEMENTS, D. J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides, **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 621-625, 2006.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v. 65, p.1270-1282, 2000.

McLOUGHLIN, A. J. Controlled release of immobilized cells as a strategy to regulate ecological competence of inocula. **Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology**, v.51, p. 1-45, 1994.

MESTDAGH, M.M; AXELOS, M.S.V. Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. **Biopolymer Science: Food and Non-food Applications**, v.91, n. 1, p.303-314, 1998.

MOE, S. T. et al, O. Alginates, In: STEPHEN, M. A. (Ed.), DEKKER, M. **Food polysaccharides and their applications**. New York, p. 245-286, 1995.

MORCH, Y. A. et al. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1471-1480, 2006.

MOYA, M. L. et al. Stability of alginate microbead properties in vitro, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, p. 903–912, 2012.

MUKAI-CORRÊA. R. **Preparo e caracterização de microcapsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe**. 178 f. 2003. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 173, 2003.

NAGANO, T. et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 941-944, 1992.

NAKAMURA, K.; NISHIMURA, Y.; HATAKEY, H. Thermal properties of water insoluble alginate films containing di and trivalent cations. **Thermochimica Acta**, v. 267, p. 343-353, 1995.

NEIRYNCK, N. et al. Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 6, p. 949- 957, 2004.

NOGUEIRA, G. F. **Produção e caracterização de micropartículas com multicamadas obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática**. 173 f. 2013. Dissertação (Mestrado Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Tradução de Fátima Murad, v.1. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005, p. 294.

ORTIZ, S. E. M.; PUPPO, M. C.; WAGNER, J. R. Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates–carrageenan systems. **Food Hydrocolloids**, v. 18 p. 1045–1053, 2004.

PASQUALIM, P. T. A. et al. Microcápsulas de alginato de cálcio e óleo vegetal pela técnica de gelificação iônica: um estudo da capacidade de encapsulamento e aplicação dermatológica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 1518-5192, 2010.

PATHAK, T.S. et al. Effect of calcium ion (cross-linker) concentration on porosity, surface morphology and thermal behavior of calcium alginate prepared from algae (*Undaria pinnatifida*), **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 633-639, 2010.

PATIL, J. S. et al. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, p. 241-248, 2010.

PENICHE, C. et al. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 865–871, 2004.

PERETZ, S. et al. Synthesis, characterization and adsorption properties of alginate porous beads, **Polymer Bulletin**, v. 72, p. 3169-3182, 2015.

PREVOST, H.; DIVIES, C. Cream fermentation by mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 7, p. 583–588, 1992.

QV, X. Y.; ZENG, Z. P.; JIANG, J. G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1596- 1603, 2011.

RABISKOVA, M., VALASKOVA, J. The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v.15, n.6, p. 747-751, 1998.

RACOVIȚĂ, S. et al. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, p.709–718, 2009.

RAJAM, R. et al. Effect of whey protein-alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **J Funct Foods**.v. 4, p. 891-898, 2012.

RÉ, M.I. Microencapsulação: em busca de produtos “inteligentes”. **Ciência hoje**, v.27, n.162, p.24-29, 2000.

RENKEMA J. M. S.; GRUPPEN, H.; VAN VLIET, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6064–6071, 2002.

ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C. C. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 8168-8173, 2005.

ROCHA, W.S. **Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose**. 2001. 87 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2001.

SANTIAGO, L.G. et al. Adsorption of soy protein isolate at air–water and oil–water interfaces, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 323, p. 155-162, 2008.

SCHMITT, C. et al. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 689-753, 1998.

SCHMITT, C. et al. Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 13 p. 483–496, 1999.

SCHOUBBEN, A. et al. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 363-369, 2010.

SEIBEL, N. F.; BELÉIA, A. D. P. Características químicas e funcionalidade tecnológica de ingredientes de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]: carboidratos e proteínas. **Braz. J. Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 113-122, 2009.

SEIBEL, N. F.; JOSÉ, A. C. S.; SILVÉRIO, G. B. Compostos químicos da soja e seus benefícios. In: SEIBEL, N. F. **Soja: cultivo, benefícios e processamento**. Curitiba, Ed. CRV, 2018. p. 32- 38.

SMILKOV, K. et al. Optimization of the formulation for preparing Lactobacillus casei loaded whey protein-Ca-alginate microparticles using full factorial design, **Journal of Microencapsulation**, v. 31, p. 166-175, 2014.

SMIDSROD, O. Solution Properties of Alginate. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 359-372, 1970.

SMRDEL, P., BOGATAJ, M., MRHAR, A. The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 77-89, 2008.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. p. 517.

SOUZA, F. N. et al. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International**, v.49, p. 560-566, 2012.

SRIAMORNSAK, P., KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 205-213, 2008.

STEPHEN, A.M.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. **Food Polysaccharides and their applications**, 2nd ed., CRC Press: Florida, 2006.

TEERANACHAIDEEKUL, V. et al. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 141, 2007.

TELLO, F. C. et al. Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. **Food Hydrocolloids**, v.43, p. 670-678, 2015.

TOLSTOGUZOV, V. B. Protein-polysaccharide interactions. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed.);DEKKER, M. **Food Proteins and Their Applications.**, New York, 1997. p. 171.

TOLSTOGUZOV, V. B. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 1-23, 2003.

TURGEON, S. L., SCHMITT, C., SANCHEZ, C. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, p. 166–178, 2007.

VELASQUEZ, M. T.; BHATHENA, S. J. Role of soy protein in obesity. **International Journal of Medical Science**, V. 4, p. 72-82, 2007.

VILLENA, M. J. M. et al. Tecnicas de microencapsulacion: una propuesta para microencapsular probioticos. **Ars Pharmaceutica**, v. 50, n. 1, p. 43-50, 2009.

WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING, S. E. Materials for Encapsulation. In : ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. A. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**, ed. Springer Science, New York, p. 31 2010. Disponível em: <
<https://pdfs.semanticscholar.org/6261/15ad191fa4132949b5d6e0351bc8ec1ecb7b.pdf> > . Acesso em: 5 de mai. 2018.

WANG, W. et al. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. **Journal of Materials Chemistry**, v.16, p.3252–3267, 2006.

WOLF, W., Legumes: Seed Composition and Structure, Processing into Protein Products and Protein Properties. In: WHITAKER, J. R. TANNENBAUM. S. R., (Eds), **Foods Proteins**. AVI Publishing Company. Westport. 1977. p. 602.

YAO, R. et al. Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation. **Biofabrication**, v.4, 2012.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, p. 406-415, 2008.

YEUNG, T. et al. Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of Bifidobacterium Longum for Oral Delivery, **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 494, 2016.

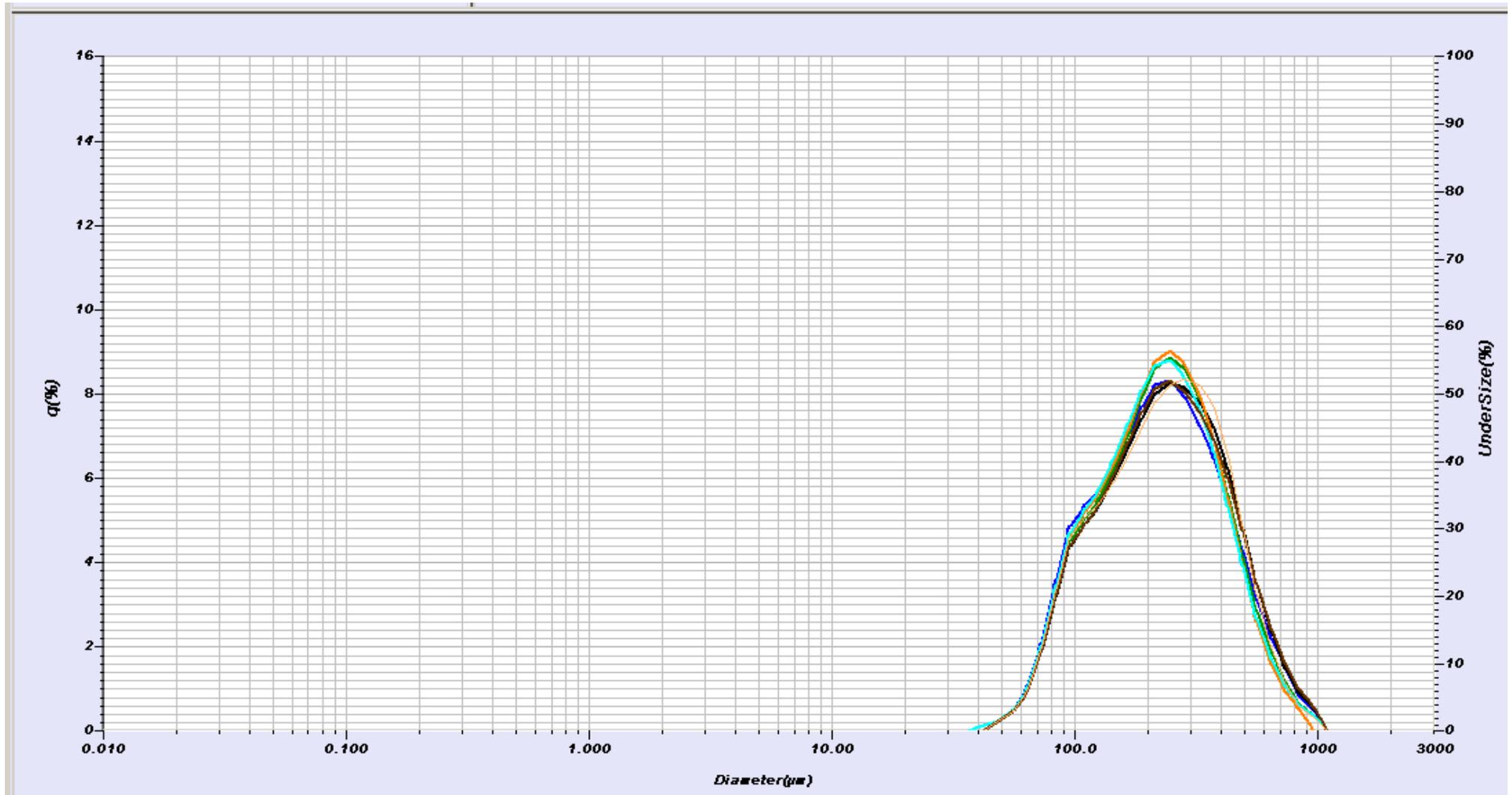
ZHANG, Z., ZHANG, R., MCLEMENTS, D.J. Encapsulation of β -carotene in alginate-based hydrogel beads: Impact on physicochemical stability and bioaccessibility, **Food Hydrocolloids**,v. 61, p. 1-10, 2016.

ZHANG, Z. et al. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH and microgel stability, protein retention and protein release, **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 308-315, 2016.

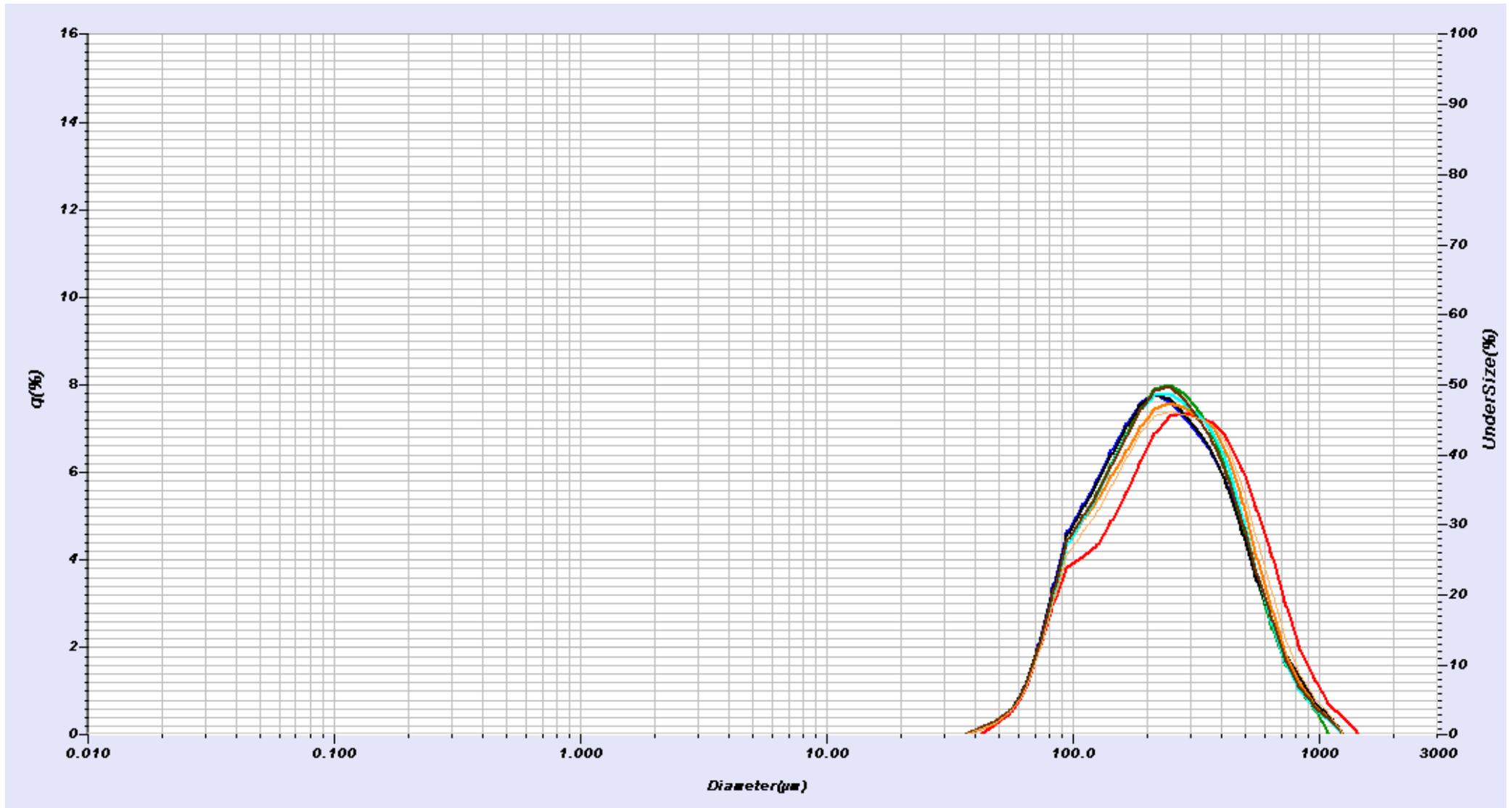
ZHAO, D. Q. et al. Isolation of a UDP-glucose: Flavonoid 5-O-glucosyltransferase gene and expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 9 - 9, 2012.

ZHEEB B. et al. Retention and release of oil-in-water emulsions from filled hydrogel beads composed of calcium alginate: impact of emulsifier type and pH, **Soft Matter**, v. 11, p. 2282-2236, 2015.

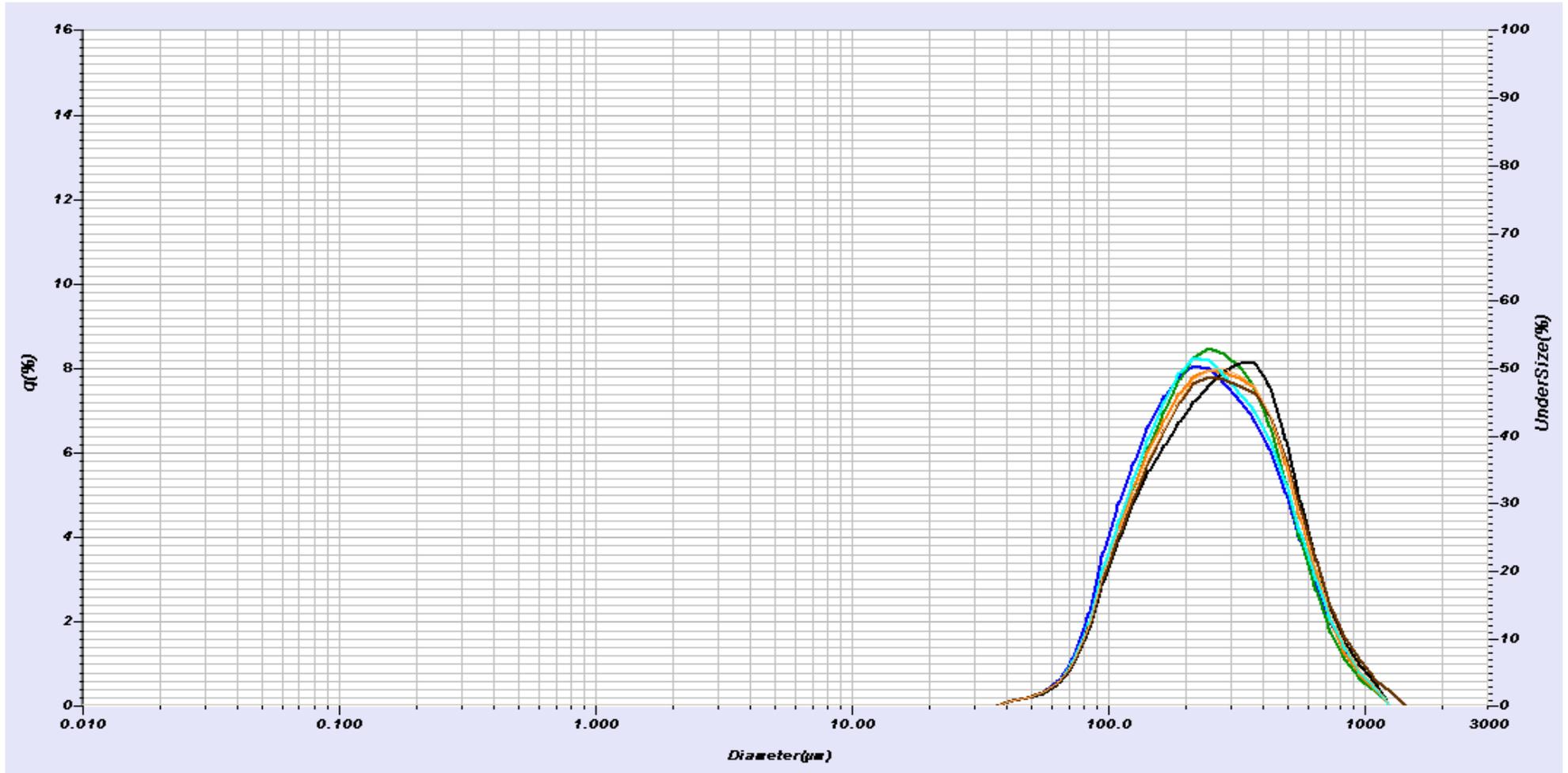
ZIMMERMANN, A. L. S. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida**. 2001. 165 f. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

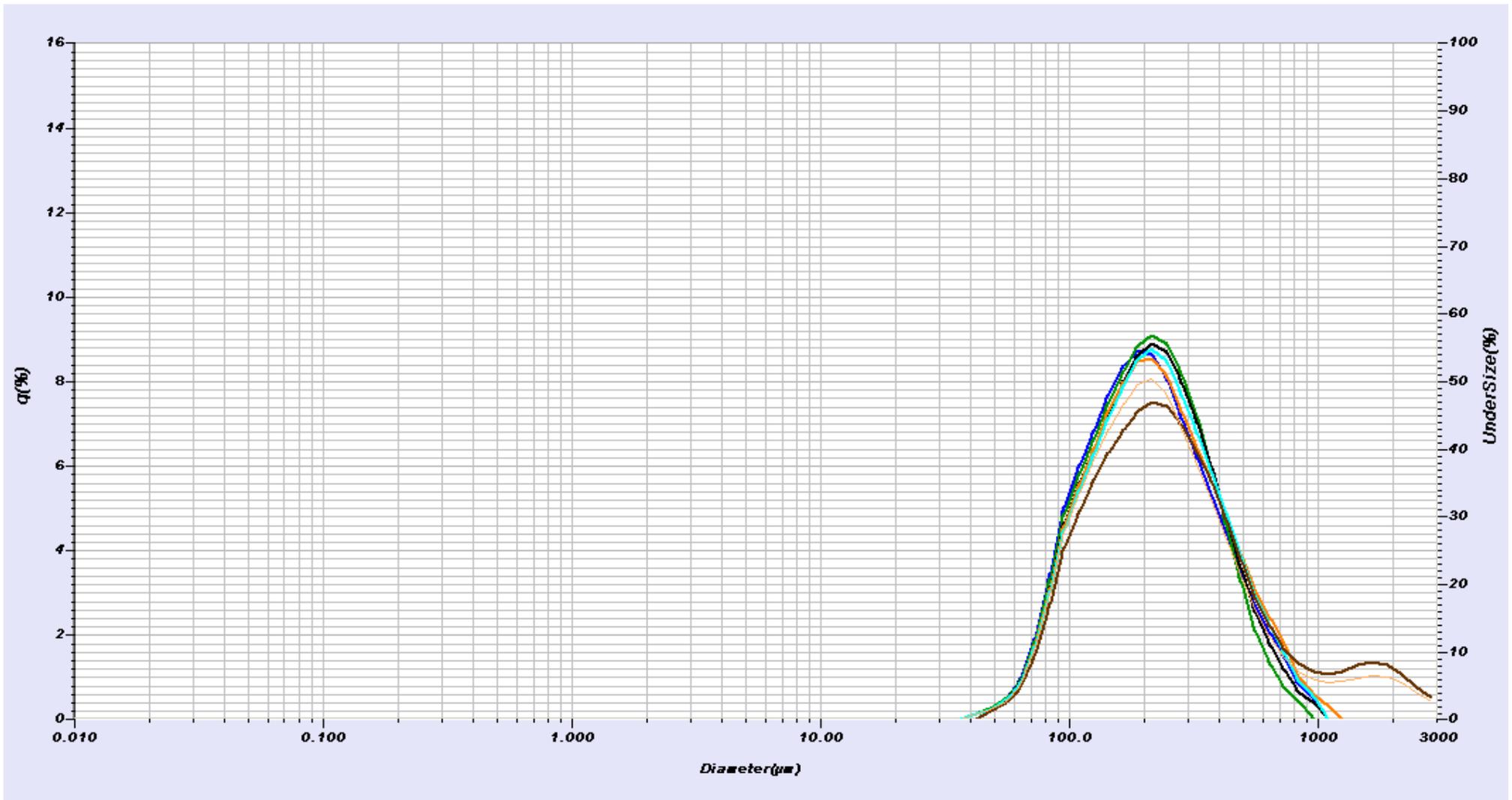
ANEXO 1 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas sem recobrimento produzida a 2,4% de CaCl_2 

ANEXO 2 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 3,5 produzida a 2,4% de CaCl_2

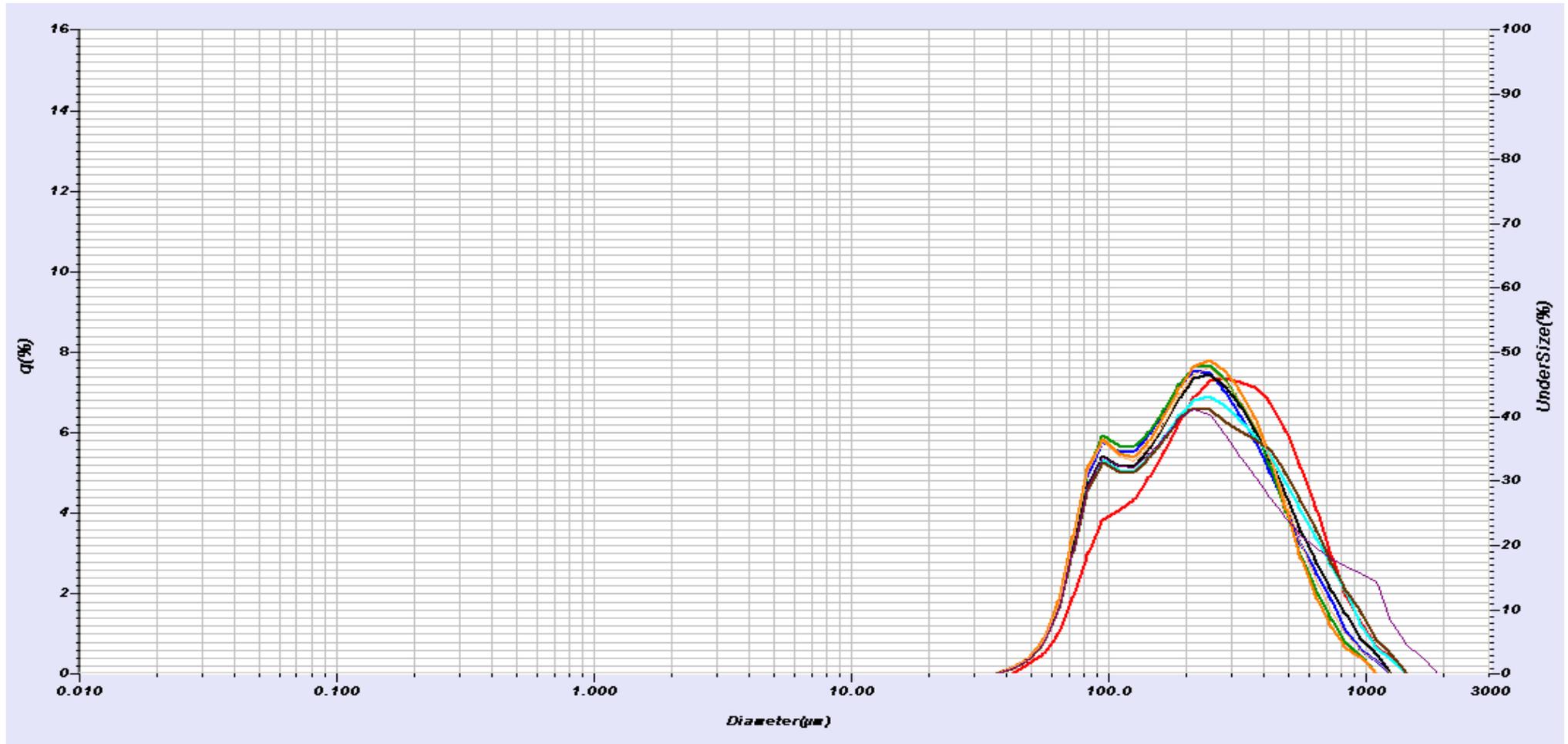


ANEXO 3 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 7,0 produzida a 2,4% de CaCl_2

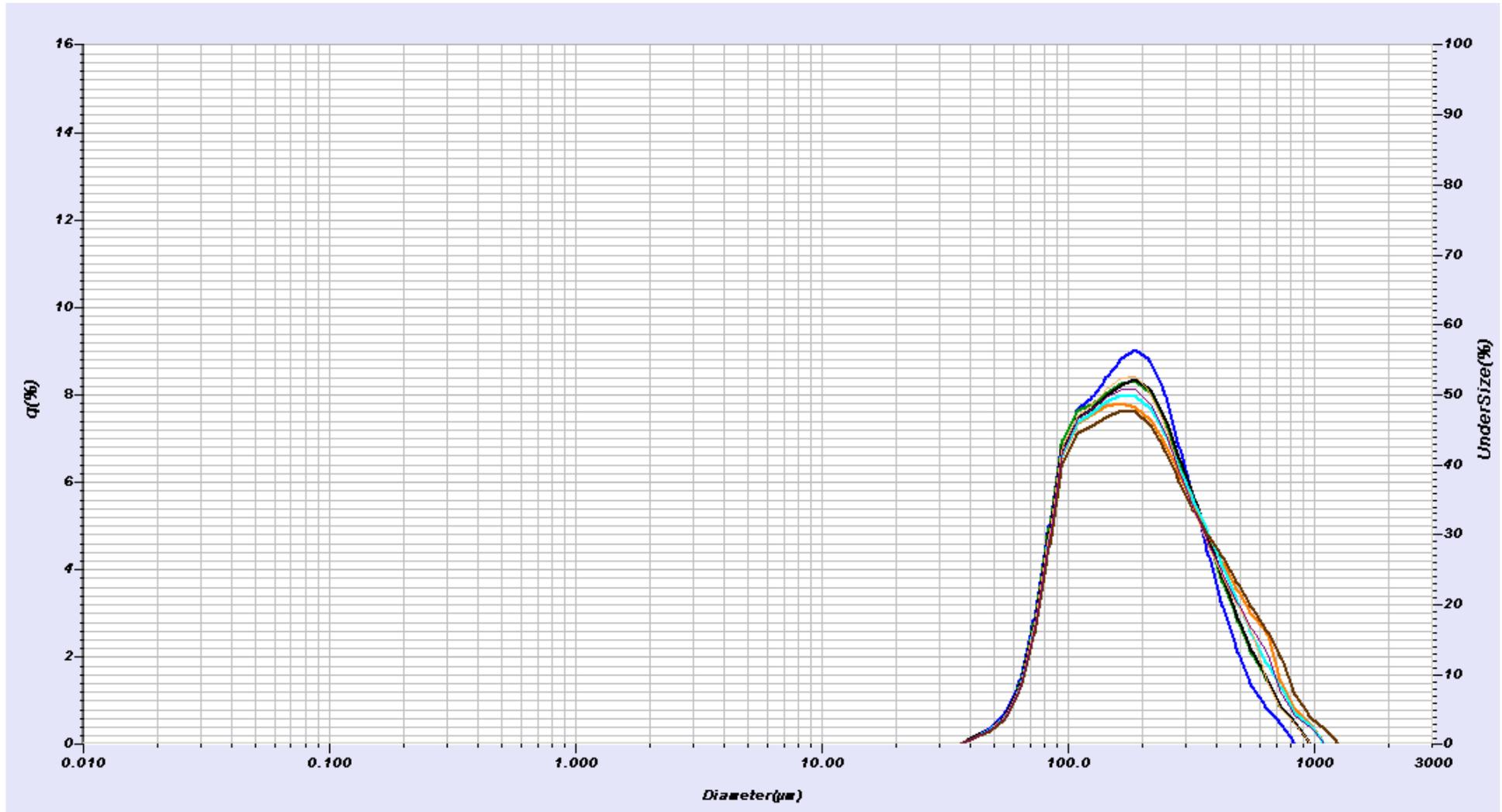


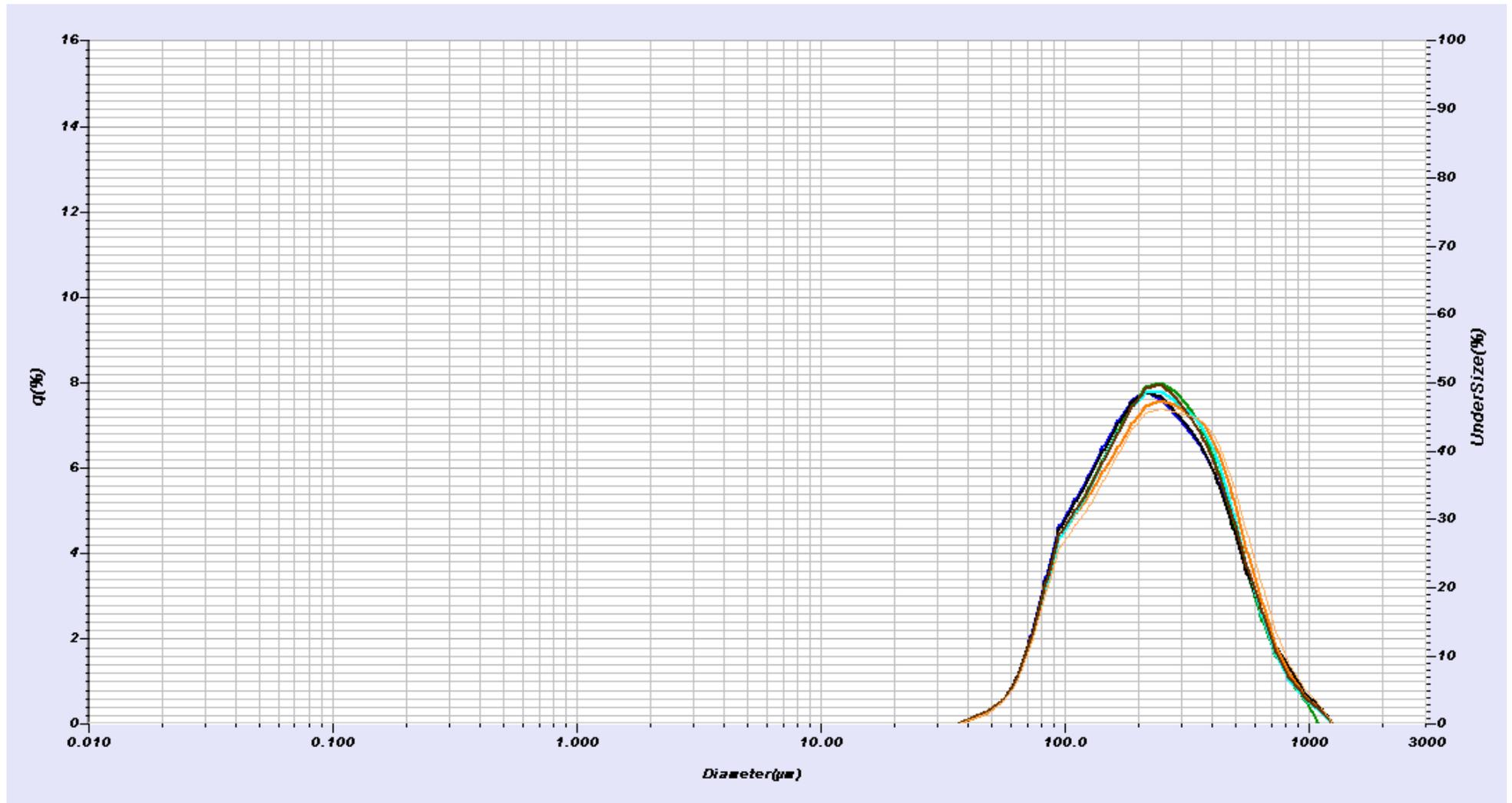
ANEXO 4 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas sem recobrimento produzida a 1,6% de CaCl_2 

ANEXO 5 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 3,5 produzida a 1,6% de CaCl_2

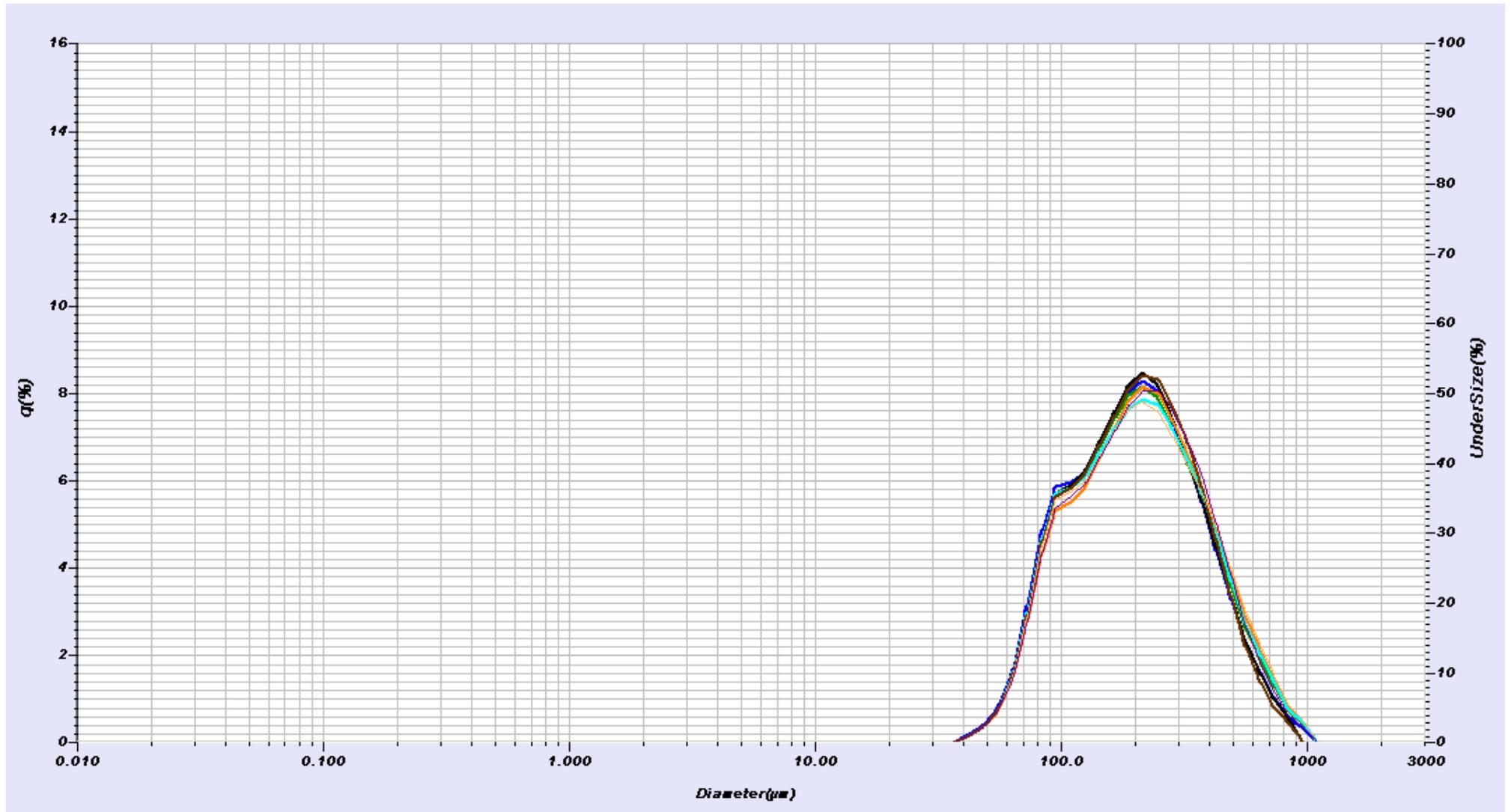


ANEXO 6 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 7,0 produzida a 1,6% de CaCl_2



ANEXO 7 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas sem recobrimento produzida a 0,8% de CaCl_2 

ANEXO 8 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 3,5 produzida a 0,8% de CaCl_2



ANEXO 9 – Gráfico de distribuição de tamanho das partículas com revestimento proteico em pH 7,0 produzida a 0,8% de CaCl₂

